

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA PROVENIENTES DE SUELOS DE LOS CANTONES
QUITO Y RUMIÑAHUI**

**AUTORAS:
YOMAIRA ELIZABETH BASTIDAS CEVALLOS
JOSSELYN KARINA VACA VIRACUCHA**

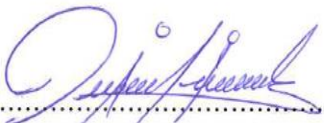
**DIRECTORA:
MARÍA ELENA MALDONADO RODRÍGUEZ**

Quito, septiembre de 2018

Cesión de derechos de autor


Nosotras, Yomaira Elizabeth Bastidas Cevallos y Josselyn Karina Vaca Viracucha, con documentos de identificación N° 1003628482 y 1723023188, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación intitulado “Caracterización de microorganismos con actividad antimicrobiana provenientes de suelos de los cantones Quito y Rumiñahui”, mismo que ha sido desarrollado para optar el título de: Ingenieras en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado por la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

(f) 

Yomaira Elizabeth Bastidas Cevallos

C-I.: 1003628482

(f) 

Josselyn Karina Vaca Viracucha

C.I.: 1723023188

Quito, septiembre del 2018

Declaración de coautoría de la docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación:
“Caracterización de microorganismos con actividad antimicrobiana provenientes de
suelos de los cantones Quito y Rumiñahui”, realizado por Yomaira Elizabeth Bastidas
Cevallos y Josselyn Karina Vaca Viracucha, obteniendo un producto que cumple con
todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser
considerados como trabajo final de titulación.

Quito, septiembre de 2018

(f).....

María Elena Maldonado Rodríguez

C.I.: 1707743157

Dedicatoria

Dedico este proyecto de titulación a Dios por ser mi guía incondicional, a las personas de mi vida, a mi mamá Elizabeth Cevallos por enseñarme la importancia del amor y el esfuerzo, a mi papá Marco Bastidas por la perseverancia y la paciencia, a mi hermana Lorena Bastidas por ser la razón que me motiva para ser mi mejor versión, a mi sobrino Daniel Puetate, quien es la mayor alegría para luchar cada día, a mis queridos tíos, tías, abuelitas y abuelitos, quienes más que eso han sido papá y mamá, me han instruido el significado esencial de la educación, unión, apoyo y el verdadero valor de una familia, a mi mejor amiga y compañera de tesis Josselyn Vaca por su lealtad e indispensable amistad todos estos años y en especial al ángel de nuestra familia, mi tío Marcelo Cevallos y mi tía Ima Sánchez por ser el ejemplo a seguir de mi vida.

El secreto de la felicidad es simple, pero de infinito reconocimiento, hacer lo que uno ama.

Yomaira Bastidas Cevallos

La presente investigación se la dedico en un principio a Dios por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, a mi madre Cita y a mi padre Carlos por su apoyo incondicional, sacrificio durante mis estudios, por saber aconsejarme en este largo camino y ser un ejemplo a seguir, a mi hermano David por levantarme en cada tropiezo y darme su voto de confianza, a mi mejor amiga Yomaira Bastidas por no solo ser mi compañera de tesis sino la hermana que nunca tuve, por la lealtad y el apoyo incondicional desde el inicio de la carrera y ahora culminar y lo más importante el saber que comparto este logro junto a ella con quien conviví no solo alegrías sino también tristezas y llantos, a mis amigos que me acompañaron durante todo este arduo camino compartiendo conmigo alegrías y fracasos y ahora se encuentran junto a mí para honrarlo.

El éxito es donde la preparación y la oportunidad se encuentran.

Josselyn Vaca Viracucha

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a María Elena Maldonado R., Ph.D. por esta gran oportunidad en la que he adquirido conocimientos valiosos por parte de ella, en la que demuestra que la difusión de la educación es el mejor regalo que un alumno puede recibir y por ser una maestra de alto impacto; a todos quienes son parte de los laboratorios de Ciencias de la Vida por su hospitalidad durante la realización de tesis, a todas las entidades de la Universidad Politécnica Salesiana que abrieron sus puertas para culminar la carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales y por brindar la oportunidad de llevar a cabo este proyecto de titulación en sus instalaciones.

Yomaira Bastidas Cevallos

Agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana, a sus autoridades e ingenieros por abrir sus puertas y darme la confianza necesaria para triunfar en la vida y transmitir sabiduría para mi formación profesional.

Agradezco de manera muy especial por su esfuerzo, dedicación, colaboración y sabiduría para ser una profesional de éxito, a la Dra., María Elena Maldonado directora de tesis, por su valiosa guía y asesoramiento a la realización de la misma.

Josselyn Vaca Viracucha

Índice de contenido

Introducción	1
Marco Conceptual	3
1.1. Microorganismos.....	3
1.1.1. Bacterias.....	4
1.1.1.1. Bacterias Gram negativas.....	5
1.1.1.2. Bacterias Gram positivas	5
1.1.1.3. Cocos.....	6
1.2. Microorganismos presentes en suelo.....	7
1.2.1. Técnica de muestreo	9
1.3. Métodos de cultivo	10
1.3.1. Medios de cultivo.....	10
1.3.1.1. Agar Nutriente.....	11
1.3.1.2. Mueller Hinton	11
1.3.1.3. Agar sangre	12
1.3.2. Aislamiento de microorganismos	14
1.3.2.1. Cultivo en placa.....	16
1.3.2.2. Dilución.....	16
1.4. Caracterización morfológica de bacterias	17
1.5. Antibióticos	17
1.5.1. Mecanismo de acción.....	18
1.5.2. Espectro de actividad	19
1.6. Ensayos de Espectro de Actividad	20
1.7. Antibiosis microbiana.....	20

1.7.1. Microorganismos capaces de producir antibióticos.....	21
1.8. Resistencia a los antibióticos.....	21
1.9. Pruebas tipo antibiograma	22
1.10. Pruebas de identificación.....	23
1.10.1. Tinción Gram.....	23
1.11. Pruebas bioquímicas	24
1.11.1. Catalasa.....	24
1.11.2. Coagulasa.....	24
1.11.3. Kit de identificación BD BBL Crystal.....	25
1.12. Efectividad del antibiótico en condiciones de estrés bacteriano	25
1.12.1. Estrés bacteriano en condiciones térmicas.....	25
1.12.2. Estrés bacteriano en condiciones de pH	26
Materiales y Métodos	27
2.1. Obtención de muestras de suelo	27
2.2. Aislamiento de microorganismos de muestras de suelo.....	28
2.2.1. Suspensión de suelo en agua estéril	28
2.2.2. Serie de diluciones	28
2.2.3. Siembra de las diluciones	29
2.2.4. Aislamiento de cepas	29
2.3. Determinación de microorganismos productores de antibióticos	29
2.3.1. Prueba tipo antibiograma y Técnica de rayado con palillos	30
2.3.2. Selección de cepas con actividad antibacteriana	31
2.4. Caracterización de microorganismos productores de antibióticos	31
2.4.1. Tinción Gram.....	31
2.4.2. Prueba de catalasa	32

2.4.3. Prueba de coagulasa.....	32
2.5. Identificación de cepas con capacidad antimicrobiana	32
2.5.1. Espectro de actividad	33
2.5.2. Método de perforación en placa.....	34
2.6. Efectividad del antibiótico en condiciones de estrés bacteriano	35
2.6.1. Preparación del preinóculo	36
2.6.2. Siembra del preinóculo en condiciones de estrés bacteriana pH y temperatura	36
2.7. Método de perforación en pocillo de agar	37
2.7.1. Preparación de cajas Petri	37
2.7.2. Colocación del antibiótico en pocillo	38
2.7.3. Análisis estadístico	38
Resultados y Discusión	39
3.1. Determinar microorganismos productores de antibióticos.....	39
3.1.1. Pruebas tipo antibiograma	39
3.2. Tinción Gram y Caracterización morfológica	40
3.3. Pruebas bioquímicas	41
3.4.1. Kits de confirmación: Kit de identificación (BD BBL Crystal)	41
3.4. Confirmación de la actividad del antibiótico.....	41
3.5.1. Espectro	41
3.5. Valoración de la efectividad del antibiótico en condiciones de estrés bacteriana.....	42
3.6. Análisis de varianza mediado por el Área Bajo la Curva del Progreso de Antibiosis (ABCPA). Prueba de Tukey (5 %)	45

3.7.1. Área Bajo la Curva del Progreso de Antibiosis de la cepa PAP48 contra <i>Bacillus spizizenii</i>	45
3.7.2. Área Bajo la Curva del Progreso de Antibiosis de la cepa PAP48 contra <i>Pseudomona aeruginosa</i>	46
3.7.3. Área Bajo la Curva del Progreso de Antibiosis de la cepa PAP49 G3A contra <i>Bacillus spizizenii</i>	48
Conclusiones	50
Recomendaciones.....	52
Lista de Referencias	53
Anexos	59

Índice de tablas

Tabla 1. Componentes medio Agar Nutriente.....	11
Tabla 2. Componentes medio Mueller Hinton Agar	12
Tabla 3. Componentes medio Agar Sangre.....	13
Tabla 4. Tratamientos en la producción del antibiótico	37
Tabla 5. Cepas seleccionadas con actividad antibacteriana	39
Tabla 6. Cepas seleccionadas con actividad antibacteriana	40
Tabla 7. Caracterización morfológica de bacterias productoras de antibióticos	40
Tabla 8. Pruebas bioquímicas	41

Índice de figuras

Figura 1. Método rayado con palillos	30
Figura 2. Método espectro de actividad	34
Figura 3. Método perforación en placa	35
Figura 4. Halos de inhibición de la cepa PAP48 contra <i>Bacillus spizizenii</i> en 9 tratamientos a diferentes condiciones de estrés	43
Figura 5. Halos de inhibición de la cepa PAP48 contra <i>Pseudomona aeruginosa</i> en 9 tratamientos a diferentes condiciones de estrés	44
Figura 6. Halos de inhibición de la cepa PAP49 G3A contra <i>Bacillus spizizenii</i> en 9 tratamientos a diferentes condiciones de estrés	44
Figura 7. Área Bajo la Curva del Progreso de Antibióticos de la PAP48 contra <i>Bacillus spizizenii</i>	46
Figura 8. Área Bajo la Curva del Progreso de Antibióticos de la PAP48 contra <i>Pseudomona aeruginosa</i>	47
Figura 9. Área Bajo la Curva del Progreso de Antibióticos de la PAP49 G3A contra <i>Bacillus spizizenii</i>	49

Índice de anexos

Anexo 1. Prueba tipo antibiograma, PAP48 (A) y PAP49G3A (C) se enfrentan a <i>Bacillus spizizenii</i> y Prueba tipo antibiograma, PAP48 (A) y PAP49G3A (C) se enfrentan a <i>Psuedomona aeruginosa</i>	59
Anexo 2. Prueba de coagulasa positiva para PAP48 y PAP49 G3A	60
Anexo 3. Prueba de catalasa positiva para PAP48 y PAP49 G3A.....	61
Anexo 4. Tinción de Gram para PAP48 y Tinción de Gram para PAP49 G3A	62
Anexo 5. Unidades formadoras de colonia aisladas de PAP48 y Unidades formadoras de colonia aisladas de PAP49 G3A	63
Anexo 6. Kit de identificación BBL Crystal.....	64
Anexo 7. Identificación de la cepa PAP48 con el programa digital del Kit de identificación BBL Crystal e Identificación de la cepa PAP49 G3A con el programa digital del Kit de identificación BBL Crystal	65
Anexo 8. Prueba de perforación en placa de <i>Micrococcus luteus</i> contra <i>Bacillus spizizenii</i> y Prueba de perforación en placa de <i>Streptococcus</i> C/G contra <i>Psuedomona aeruginosa</i>	66
Anexo 9. Espectro de actividad de <i>Streptococcus</i> C/G contra <i>Bacillus spizizenii</i>	67

Resumen

Actualmente, la resistencia antibiótica a nivel mundial, es un grave problema que empeora cada día, razón por la cual, las industrias farmacéuticas, biotecnológicas y de ramas de la salud están destinadas a aportar soluciones a este problema, para lo cual se han unido para crear nuevos antibióticos obtenidos de recursos naturales, que tienen como finalidad la sustitución de antibacterianos fabricados químicamente u obtenidos de manera natural que actualmente, ya no tienen la misma efectividad frente a infecciones.

La presente investigación se centra en la caracterización de cepas, con capacidad de producir antibióticos, extraídas de muestras de suelo de los cantones Quito y Rumiñahui; se aisló dos cepas diferentes que fueron referidas con los códigos: PAP48 y PAP49 G3A, las mismas que se sometieron a pruebas bioquímicas y kits de identificación para determinar a qué grupo taxonómico pertenecen. También se realizaron pruebas tipo antibiograma, espectro de actividad, para determinar el tipo de antibiótico que produce la cepa. Las cepas identificadas fueron: *Micrococcus luteus* (PAP49 G3A) y *Streptococcus* grupo C/G (PAP48), con el 98,69 % y 99,83 % de identificación respectivamente.

Palabras clave: antibiosis, espectro de actividad, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus* grupo C/G.

Abstract

Currently, antibiotic resistance worldwide is a serious problem that worsens every day, which is why the pharmaceutical, biotechnology and health industries are destined to provide solutions to this problem, for which they have joined forces to create new antibiotics obtained from natural resources, which have the purpose of replacing chemically manufactured antibacterials or naturally obtained ones that currently do not have the same effectiveness against infections.

The present investigation focuses on the characterization of strains, with the capacity to produce antibiotics, extracted from soil samples from the Quito and Rumiñahui cantons; Two different strains were isolated, which were referenced with the codes: PAP48 and PAP49 G3A, which were subjected to biochemical tests and identification kits to determine which taxonomic group they belong to. Antibigram type tests, spectrum of activity, were also carried out to determine the type of antibiotic produced by the strain. The strains identified were: *Micrococcus luteus* (PAP49 G3A) and *Streptococcus* Group C / G (PAP48), with 98,69 % and 99,83 % identification respectively.

Keywords: antibiosis, spectrum of activity, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus* group C/G.

Introducción

Con el paso de los años se ha comprobado la idea errónea que se ha mantenido sobre el auge de los antibióticos, al asegurar a la población que es la solución a todas las infecciones bacterianas en humanos; sin embargo, los mismos microorganismos se han encargado de borrar ese pensamiento optimista de los científicos, por su capacidad de desarrollar resistencia a antibióticos, inconveniente que se manifiesta con gran fuerza en los últimos tiempos, a casusa del mal uso que se les ha dado. Un ejemplo es: el caso de *Acinetobacter*, cocobacilo Gram negativo, microorganismo causante de infecciones graves en pacientes inmunocomprometidos, que afecta en hospitales por un inapropiado lavado de manos y desinfección de equipos médicos y superficies hospitalarias; el mismo que se ha vuelto resistente a la penicilina, cefalosporinas, tetraciclinas, cloranfenicol, aminoglucósidos, en los últimos años (Rada, 2016).

Como lo manifiesta (Nguyen et al., 2016) y (Sengupta, Pramanik, Ghosh, y Bhattacharyya, 2015) es indispensable el avance y el desarrollo investigativo de nuevas cepas capaces de producir nuevos agentes antimicrobianos de amplio espectro para combatir patógenos multiresistentes como por ejemplo el aislamiento de actinomicetos bioactivos capaces de producir metabolitos secundarios como: *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, entre otros.

El suelo, puede dar una opción de aislamiento de cepas con actividad antimicrobiana, por ser una fuente natural rica en microorganismo, como demuestra (Lee et al., 2012) en su estudio, en el cual se aisló e identificó actinobacterias con esta capacidad, aplicando herramientas moleculares, así como también se realizó la identificación de sus metabolitos secundarios.

El proyecto tiene como objetivos: caracterizar microorganismos con actividad antimicrobiana provenientes de suelos de los sectores de Guápulo perteneciente al cantón Quito y del Valle de los Chillos perteneciente al cantón Rumiñahui; aislar microorganismos procedentes de las muestras de suelo; determinar microorganismos productores de antibióticos; e identificar la o las cepas productoras de antibióticos mediante pruebas bioquímicas y kits de identificación.

Para la identificación de las cepas PAP48 y PAP49 G3A se sometieron a tinción Gram, diversas pruebas bioquímicas (catalasa, coagulasa), donde el resultado fue cocos Gram positivos. Para determinar su género y especie se usó el kit de identificación (BD BBL Crystal) para bacterias Gram positivas.

En pruebas tipo antibiograma se enfrentaron a *Bacillus spizizenii* y *Pseudomona aeruginosa*; además de ser expuestas a cepas certificadas para conocer su espectro de actividad con *Bacillus spizizenii*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida albicans*, *Micrococcus yunnanensis* y *Serratia marcescens*.

Capítulo 1

Marco Conceptual

1.1. Microorganismos

Para hablar sobre microbios se debe referir en primera instancia a lo que abarca la microbiología, que es el estudio de microorganismos (Sánchez, 2010). Éstas criaturas son las más primitivas y numerosas que existen en todo el planeta y se tiene evidencia de que están por todas partes y ambientes: suelo, agua y aire, por lo que son vitales en todos los ecosistemas e interaccionan de forma continua con plantas, animales y el hombre (Montaño, Sandoval, Camargo y Sánchez, 2010).

Este enorme grupo de seres prehistóricos son clave para el funcionamiento de la vida y además de la naturaleza tanto física como química del planeta. (Morse y Meitzner, 2011a) afirman:

Son los encargados de los ciclos de los elementos químicos indispensables para la vida, incluidos carbono, nitrógeno, azufre, hidrógeno y oxígeno; además, los microorganismos realizan más fotosíntesis que las plantas verdes. Se calcula que en la tierra existen 5×10^{30} células microbianas; excluyendo a la celulosa, éstas constituyen 90 % de la biomasa de toda la biosfera. Los seres humanos tienen una relación estrecha con los microorganismos; más de 90 % de las células del cuerpo corresponde a microbios. (p. 1)

Fundamentos mencionados con anterioridad hacen que el hombre sea dependiente de ellos para sobrevivir. Ayudan a satisfacer la demanda alimenticia, farmacéutica, son

aplicados para resolver problemas ecológicos y de contaminación ambiental (Montaño et al., 2010).

1.1.1. Bacterias

Dentro del inmenso grupo de microorganismos se encuentra a las bacterias, que son células procariotas (Montaño et al., 2010), que se han descubierto desde tiempos remotos y como afirman (Bueno, Palavecino, Tobar, Nieto y Sebastián, 2015): tienen un tamaño inferior a las células del cuerpo humano, además de poseer diversas formas, que pueden llegar a ser observadas con la ayuda de un microscopio electrónico. Se ha podido demostrar que la gran parte de las especies de bacterias no son patógenas, una de las razones es que permiten mantener en condiciones adecuadas la salud de las personas, al ser parte vital del cuerpo humano, como en la piel y los intestinos, siempre y cuando estén en concentraciones adecuadas, de otra manera si estas bacterias se reproducen en número excesivo pueden ocasionar enfermedades. Existen infecciones muy comunes causadas por bacterias, como son: espinillas, caries y diarrea (Bueno et al., 2015).

Se puede identificar dos divisiones dentro de las bacterias, las primeras son las arqueobacterias que tienen la capacidad de vivir en medios ácidos y salinos, debido a que carecen de peptidoglicano; las segundas son las eubacterias que habitan en organismos vivos al poseer peptidoglicano (Vargas, 2014).

Gran número de bacterias se diferencian, como Gram positivas o Gram negativas con base en respuesta al método de tinción de Gram, la cual está fundamentada en la capacidad de bacterias Gram positivas para retener un complejo de cristal violeta, además de yodo después de haber sido sometidas a un rápido lavado con alcohol o

acetona. Por otro lado las bacterias Gram negativas no tienen dicha capacidad de retención y se vuelven translúcidas, pero pueden volverse a teñir y obtener una tonalidad de color rojo con el colorante safranina (Morse y Meitzner, 2011a).

1.1.1.1. Bacterias Gram negativas

Este tipo de bacterias van a diferir de las Gram positivas debido a que toman el último colorante utilizado en la técnica Gram, que es la safranina, por lo que pueden tornarse rojas. Esta coloración se debe a que las bacterias Gram negativas poseen una fina capa de peptidoglucano (Lucana y Huanca, 2014).

Por lo que al referirse a la pared celular (Lucana y Huanca, 2014), testifican que se encuentra constituida por tres estructuras, membrana citoplasmática, espacio periplasmático o periplasma, este espacio presenta una delgada capa de peptidoglucano, además de que por fuera se encuentra una última estructura denominada membrana externa.

1.1.1.2. Bacterias Gram positivas

En las bacterias Gram positivas el peptidoglucano se encuentra presente en numerosas capas, además de ácidos teicoicos que se encuentran conformados por polímeros de ribitolfosfato o glicerol-fosfato que están unidos al ácido N acetil-murámico, esto permite estabilizar la pared celular, además de actuar como antígenos de superficie y unirse a receptores específicos en células del huésped.

Por las razones mencionadas es posible afirmar que las bacterias Gram positivas se tiñen de color violáceo, debido a que presentan numerosas capas de peptidoglucano (Lucana y Huanca, 2014).

Un método de clasificación para grupos de bacterias Gram positivas es la variación de la cubierta de proteínas junto a los ácidos teicoicos. Otros componentes esenciales de la pared celular de este tipo de bacterias son los denominados ácidos lipoteicoicos que por medio de su porción lipídica de forma hidrófoba se van a unir a la membrana y la porción glicerol-fosfato de la pared celular.

1.1.1.3. Cocos

Esta clasificación de bacterias, sean Gram negativos o Gram positivos, son de aspecto redondeado.

Hay una gran variedad de cocos descubiertos, los cuales pueden aparecer aislados o agrupados de diferente manera: en grupos de dos, como los diplococos; en otras ocasiones como cadenas arrosariadas, en este caso se tiene a los estreptococos, y grupos arracimados, como estafilococos, o masas cúbicas, las sarcinas son un ejemplo de estas. Cabe mencionar que son bacterias que tienen muy poca relación con el exterior; sin embargo, son resistentes y se transmiten a través del aire (Sánchez, 2010). Es preciso recalcar que suelen ser patógenas, además de pequeñas y exigentes con el medio de cultivo (Sánchez, 2010).

Es preciso mencionar que sus agrupaciones son homogéneas. Como resultado de la predisposición de la células a mantenerse unidas cuando sucede la división celular llegan a tomar diversas formas (Vargas y Kuno, 2014).

Se puede mencionar que los cocos Gram positivos son microorganismos unicelulares, estos son diferenciados del resto de bacterias por poseer una forma esférica, se los puede clasificar en, diplococos; los tetracocos; sarcina, en los que los microorganismos adquieren paquetes de entre ocho o más micrococos.

Por otra parte se hace referencia a los requerimientos atmosféricos, como método de clasificación, en los cuales se puede encontrar a cocos aerobios y anerobios facultativos, estos están representados por la familia de *Micrococcaceae* que comprende a los *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Streptococcus*, entre otros; *Peptococcus* y *Peptoestreptococcus* son ejemplos de anaerobios estrictos (Quispe y Hilari, 2014).

Es preciso mencionar que una manera de diferenciar el género *Streptococcus* (A, B, C, D, E, F, etc.), es mediante la unión del peptidoglicano de las bacterias Gram positivas con la proteína M del microorganismo y también pueden vincularse polisacáridos como el C, por ejemplo en el caso de *Streptococcus pyogenes* o *Streptococcus* grupo A (GAS), también, p, proceso que permite esta clasificación (Pírez, 2002).

1.2. Microorganismos presentes en suelo

Existe una inmensa diversidad de microorganismos en el suelo, de los cuales se conoce que bacterias y hongos son los más abundantes; de los géneros de bacterias con mayor estudio se encuentran: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Azospirillum* (García, 2011).

El suelo es el hábitat ideal para el desarrollo de los microorganismos, proporciona ciertas cualidades para que estos microbios puedan acoplarse a este sistema natural; sin embargo, es preciso que el suelo cuente con una buena estructura donde el agua y

el aire circulen con facilidad y se hallen en un equilibrio que permita el desarrollo de las colonias de microorganismos. Se sabe a ciencia cierta que la concentración de microorganismos más abundante se encuentra en la zona cercana a las raíces o rizósfera que está caracterizada por el aumento de la biomasa microbiana y de su actividad, donde las bacterias y hongos, en asociación con las raíces, forman comunidades únicas que tienen considerable potencial para la detoxificación de compuestos orgánicos nocivos (Asociación Vida Sana, 2015).

Conocimientos que se debe tomar en cuenta para saber que una pequeña muestra de tierra, que ha sido manipulada de manera apropiada, da paso al cultivo de diferentes tipos de microorganismos. Para la tierra fértil (húmeda, aireada, rica en minerales y material orgánico) significa que pueden aislarse cientos o incluso miles de cepas bacterianas (Morse y Meitzner, 2011b).

Ibáñez (2015) refiere que la producción de diversos antibióticos a partir de bacterias del suelo, pueden ser uno de los factores que regulan la diversidad y composición de los ecosistemas forestales tropicales. Las bacterias que habitan en el suelo productoras de antibacterianos son la fuente de muchos de los antibióticos utilizados para combatir infecciones e inhibir el crecimiento de diversos patógenos en los seres humanos y las plantas. Manifiestan de igual manera que la producción de antibióticos por bacterias del suelo cada vez abarca un tema más grande; sin embargo, la abundancia y la actividad de los microorganismos varían con el paisaje, así como de la disponibilidad de nutrientes.

Por lo cual, es preciso mencionar que el suelo es una fuente de microorganismos con capacidad antibiótica de gran relevancia, que podrán ser aislados y ayudarán a combatir infecciones en los seres humanos. Se estima que el 99 % de todas las especies

bacterianas que viven en el medio ambiente podrían contribuir a la obtención de nuevos antibióticos. El problema radica en que son bacterias no cultivables, es decir, que no pueden crecer en condiciones experimentales o de laboratorio, crecen únicamente en su hábitat natural; razones como esta, han impulsado a investigadores del campo de la microbiología, química, biotecnología, a centrar sus esfuerzos en el estudio de estos antibacterianos (Muñoz, 2017).

1.2.1. Técnica de muestreo

Se han establecido innumerables formas de muestreo; para ello es recomendable que se realice en zonas cercanas a donde se va a llevar la investigación, esto con la finalidad de asegurar mayor efectividad de los microorganismos en el suelo; debido a que la biota natural del lugar de muestreo está adaptada al tipo de materia orgánica, temperatura, humedad, entre otros. La recolección de suelo se la puede realizar dentro de bolsas o sacos (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), 2012).

Es indispensable sin duda la técnica de muestreo empleada, pues de ella depende que los resultados del proyecto sean representativos. Para estudios microbiológicos recomiendan una profundidad de muestreo de 0-20 cm, debido a que en esa zona se localiza la mayor abundancia y actividad microbiana. Es indicado llevar las muestras a refrigeración (4-5 °C) cuando el tiempo de uso no será inmediato, para no alterar la composición del suelo; además de cerciorarse de que los recipientes, fundas, envases donde se mantienen las muestras de suelo estén correctamente cerrados, con bajo potencial de contaminación de la muestra y alteración de las propiedades químicas del

material elegido para la técnica de muestreo (Facultad de Ciencias Agropecuarias, 2015).

De la misma manera en otros estudios se recomienda muestrear en zigzag o al azar, para una recolección superficial (0-10 cm). Indican que se debe obtener muestras de unos 200 a 500 g, las cuales se colocan en una bolsa plástica nueva, se sella y rotula adecuadamente. Posterior se llevan las muestras a un sitio fresco (puede ser en un cooler), con el objetivo de evitar pérdida de humedad y modificaciones de temperatura (Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, 2015).

1.3. Métodos de cultivo

1.3.1. Medios de cultivo

Para que los microorganismos crezcan apropiadamente en un medio de cultivo artificial deben reclutar una serie de condiciones, entre las que se encuentra: temperatura, grado de acidez y alcalinidad humedad y presión de oxígeno adecuadas. También es esencial que un medio de cultivo reúna ciertos parámetros de inocuidad, factores de crecimiento y nutrientes necesarios. Uno de los componentes altamente empleados en la realización de medios de cultivo es el agar o solidificante, asimismo se conforman por numerosos materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, para aumentar el valor nutritivo (Casado, Torrico y Medina, 2012).

El suero y la sangre son aditivos fundamentales de los medios de cultivo para aquellas bacterias más estrictas, como es el caso de: *Eikenella corrodens*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* que requieren 5 % de sangre; de igual manera

para bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* (Asociación Argentina de Microbiología, 2016).

Alguno de los medios de cultivo más usados.

1.3.1.1. Agar Nutriente

Es un medio de cultivo sólido usado regularmente como rutina para todo tipo de bacteria. La ventaja es que al crecer las colonias en la superficie facilita la distinción de microorganismos (Casado et al., 2012).

Este medio de cultivo está compuesto por:

Tabla 1.

Componentes medio Agar Nutriente

Componentes	g/L
Pluripeptona	5
Extracto de carne	3
Cloruro de sodio	8
Agar	15
pH 7,3 +/- 0,2	

Fuente: (Britania, 2015)

Elaborado por: Las autoras, 2018

1.3.1.2. Mueller Hinton

Este medio nutritivo sólido es favorecido a nivel mundial para realizar pruebas tipo antibiograma, así como, pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos al ser un sistema

no selectivo que promueve el desarrollo de microorganismos, por la baja presencia de inhibidores de tetraciclinas, sulfonamidas y trimetoprimas.

Por lo que posee una alta eficacia frente a investigaciones de antibacterianos (Britania, 2001a).

Medio de cultivo nutritivo deshidratado que se caracteriza por tener la capacidad de permitir a patógenos crecer de manera muy fácil, por razones explicadas anteriormente, es de color beige, homogéneo; al suplementar con sangre de cordero al 5 % Mueller Hinton Agar, es usado para pruebas de sensibilidad para especies de estreptococos y aislamiento de microbios nutricionalmente exigentes (Britania, 2001a).

La composición de este medio es la siguiente:

Tabla 2.

Componentes medio Mueller Hinton Agar

Componentes	g/L
Infusión de carne	300
Peptona ácida de caseína	17,5
Almidón	1,5
Agar	15
pH 7,3 +/- 0,1	

Fuente: (Britania, 2001a)

Elaborado por: Las autoras, 2018

1.3.1.3. Agar sangre

Medio de cultivo que sirve para aislamiento de cientos de microorganismos nutricionalmente exigentes, es un suplemento con sangre ovina donde se pretende presenciar reacciones de hemólisis (Britania, 2001b).

En 1966 Ellner et. al propusieron una nueva composición del medio de cultivo agar sangre, que se ha designado como Agar Columbia. Este medio se fundamenta por las propiedades de cada ingrediente, como peptonas y extracto de levadura que actúan como fuente de vitaminas del complejo B. Para absorber derivados tóxicos propios de la muestra y como fuente de energía para microorganismos que poseen alfa-amilasas, está el almidón de maíz. En cuanto a la sangre de cordero permite detectar las reacciones hemolíticas. Algunas de las características de este medio es que las colonias suelen ser más grandes y el crecimiento más profuso (BD Company, 2013).

Los componentes de este medio de cultivo se exponen a continuación:

Tabla 3.

Componentes medio Agar Sangre

Componentes	g/L
Digerido pancreático de caseína	12
Digerido péptico de tejido animal	5
Extracto de levadura	3
Extracto de carne bovina	3
Almidón de maíz	1
Cloruro sódico	5
Agar	13,5
Sangre de carnero, desfibrinada	5 %
pH 7,3 +/- 0,2	

Fuente: (BD Company, 2013)

Elaborado por: Las autoras, 2018

1.3.2. Aislamiento de microorganismos

Para poder llevar a cabo el proceso de aislamiento bacteriano es preciso el enriquecimiento de cultivos, que consiste en preparar un medio de cultivo que favorece el crecimiento de los microorganismos para su posterior selección (Morse y Meitzner, 2011b). Un sin número de microorganismos pueden ser aislados de diversas fuentes naturales que el hombre tiene a su disposición como es el suelo.

Sin embargo, también son diversas las bacterias no cultivadas, pese al gran esfuerzo de avances científicos para establecer ambientes óptimos para cualquier tipo de microorganismo (Morse y Meitzner, 2011b).

De los microorganismos obtenidos de una muestra como el suelo, se escoge una sola colonia de forma tal que su progenie permanezca aislada. Se dispone de varios métodos. Uno de ellos es por diseminación en la superficie de un medio sólido en placa de Petri, la cual es la técnica más usada, donde con la ayuda de un ansa de siembra, calentada al rojo vivo en el mechero y enfriada cerca del mismo, se toma una muestra del cultivo de microorganismos y se extiende sobre la superficie de la placa con el medio agar gelificado, pero sin hacer presión para no dañar el agar. Se lleva la placa a incubar a la temperatura adecuada, siempre en posición invertida lo que evitará que el agua de condensación se deposite sobre la superficie del medio, dificultando la obtención de colonias aisladas.

Mediante éstas técnicas se obtienen colonias aisladas a partir de una muestra que contenga un elevado número de bacterias.

Se puede sembrar por, agotamiento de asa, en la cual se flamea el asa, se enfría y después de rozar la siembra realizada previamente, se realizan estrías en dos placas en forma consecutiva sin recargar el asa.

Mientras que, por depósito y posterior quemado, se carga el ansa con la muestra y las estrías se extienden sobre un área pequeña de la superficie de la placa. Se retira el ansa, se quema a la llama, y luego de enfriarla en el interior de la placa se hacen nuevas estrías por otra zona tocando ligeramente la muestra sembrada anteriormente. Este proceso puede repetirse sucesivamente, flameando y enfriando el ansa al comienzo de las sucesivas siembras en estría, de acuerdo a la carga inicial de microorganismos. Tras la incubación, se observarán las colonias aisladas en alguna región de la placa inoculada, donde se puede estudiar la morfología colonial.

Otro de los métodos a emplear es la dilución previa en solución fisiológica o caldo, para esto se toma la muestra para aislar y se la resuspende en solución fisiológica o caldo nutritivo, preparando luego diluciones seriadas decimales en condiciones asépticas. Se toman las diluciones y se estría con ellas una placa para cada una. En la dilución adecuada se obtendrán colonias aisladas.

Por último, se tiene la extensión en superficie con espátula de Drigalski, en este procedimiento pueden prepararse diluciones decimales. Se deposita sobre la superficie de la placa una gota o 0,1 mL de una determinada dilución del cultivo de microorganismos problema y se extiende con ayuda de la espátula, previamente esterilizada por flameado, en todas las direcciones hasta que esté completamente seco. Tras el período de incubación las colonias aparecen sobre la superficie, distribuidas uniformemente si la siembra se ha realizado de forma correcta. Podrán diferenciarse las colonias de acuerdo a su tamaño, forma, color, textura, etc. Esta técnica de siembra, además de permitir el aislamiento de colonias, permite el recuento de bacterias viables en la muestra, si conocemos exactamente el volumen de muestra sembrado (Schujman, 2018).

1.3.2.1. Cultivo en placa

En esta técnica las unidades formadoras de colonias (ufc) se encuentran en un medio sólido que da como resultado la proliferación de cada una. Se menciona el método de vertido en placa donde una suspensión de células con agar líquido se vierte en una caja de Petri. Al momento de que el agar se haya solidificado, las ufc, permanecen inmóviles y se reproducen dando origen a colonias.

Cuando la suspensión celular está lo suficientemente diluida, las unidades formadoras de colonia se encontrarán bien separadas. Sin embargo, para tener la certeza es necesario suspender en agua estéril una colonia del tipo deseado y repetir el procedimiento. Conforme se realiza este proceso por varias se puede obtener un cultivo puro.

Otro método conocido como técnica de estriado en placa consiste en realizar estrías de la suspensión original sobre una placa de agar con la ayuda de un asa de platino. A medida que se continúa con la creación de estrías, el número de microorganismos reduce su número (Morse y Meitzner, 2011b).

1.3.2.2. Dilución

Este método se lo puede considerar cualitativo como cuantitativo. La dilución permite diferenciar la morfología de las colonias, por lo que es cualitativa; mientras que es cuantitativo porque va a dar como dato, el número de microorganismos que hay en una suspensión. El procedimiento debe ser bajo condiciones de esterilidad y se basa en realizar diluciones sucesivas de la muestra, lo que lleva a disminuir la cantidad de microbios de la suspensión inicial, ya que se tiene como finalidad la siembra de un

número específico de microorganismos en cajas Petri, así como la obtención de colonias separadas en un número óptimo para su recuento o evaluar el número de microbios viables en la muestra. Estas pueden ser llevadas a cabo dentro de tubos de ensayo con una disolución mineral isotónica con el objeto de mantener la viabilidad de las células (García, 2010).

1.4. Caracterización morfológica de bacterias

Las bacterias se multiplican rápidamente y son visible como ufc, cuando se las siembra en medios de cultivos sólidos adecuados. Una unidad formadora de colonia está constituida por una o más características como:

El tamaño puede variar desde 0,5 mm o más, como las enterobacterias. Las formas de la colonia pueden ser: irregular, puntiforme, circular. Los bordes pueden ser ondulados, enteros, lobulados, filamentosos. Entre los tipos de superficie de la colonia se encuentran: plana, convexa y elevada.

Con relación al pigmento que adquieren este puede ser: verde, amarillo y grisáceo. Existe otro comportamiento muy importante frente a la luz: brillante u opacas (Mota y Pérez, 2008).

1.5. Antibióticos

Son aquellas sustancias químicas que inhiben el crecimiento de bacterias (bacteriostáticos) o causan su muerte (bactericidas), también conocidos como antimicrobianos que pueden ser producidos de fuentes biológicas como bacterias y hongos. La infinita necesidad de producir antibióticos para eliminar enfermedades

infecciosas nace con el descubrimiento de la penicilina (Muñoz, Arango y Jaramillo, 2004). Este enorme aporte a la ciencia por Fleming en 1929, marca claramente el inicio del auge de la edad de oro de los antibióticos (Seija y Vignoli, 2008), razón por la cual se ha vuelto importante poder mejorar cada día más el progreso de este descubrimiento, como por ejemplo dar a conocer el descubrimiento en el suelo de antimicrobianos, molécula natural (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintética o semisintética, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos (Seija y Vignoli, 2008).

1.5.1. Mecanismo de acción

Con el propósito de destruir o inhibir a los microorganismos, los antibióticos tienen diversos mecanismos de acción, principalmente se basan en: impedir la síntesis de ácidos nucleicos, así como de proteínas o de la pared celular y alterando la membrana celular de la bacteria (Daza, 1998).

Los antimicrobianos actúan solamente frente a microorganismos que están en crecimiento activo; al interferir con la síntesis de peptidoglicanos, afectando la integridad de la pared bacteriana, que conlleva a problemas como es la lisis de la pared celular. Otro de los mecanismos de acción de los antibióticos frente a bacterias es su actividad catiónica detergente que afectan a la membrana de las bacterias Gram negativas. También los agentes antimicrobianos interfieren con la síntesis de proteínas, al actúan a nivel del organoide encargado de su elaboración que es el ribosoma, como es el caso de los: Aminoglucósidos y aminociclitolos, tetraciclinas, cloranfenicol, entre otros. Los aminoglucósidos y aminociclitolos propios de los antibacterianos actúan a nivel de la porción 30 S del ribosoma, induciendo errores en la lectura de la

información aportada por el ARN mensajero. De este modo, la proteína sintetizada adquirirá errores y su función no será útil. El mecanismo de acción que interfiere con la producción normal de los ácidos nucleicos, como las sulfamidas y trimetoprima cuya acción como antimetabolitos impidiendo la síntesis de purinas los distingue del resto. Las tetraciclinas, de igual manera se unen al ribosoma en la porción 30 S, de forma parecida a lo que ocurre con los aminoglucósidos. Cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol, en cambio actúan en la porción 50 S del ribosoma, inhibiendo la transpeptidasa, lo que impide que se formen los péptidos. Otro mecanismo de acción consiste en imposibilitar el superenrollamiento de las cadenas de ADN, por inhabilitación de la topoisomerasa. Conjuntamente pueden reprimir la separación de las mismas cadenas (Errecalde, 2004).

1.5.2. Espectro de actividad

Es preciso mencionar el efecto que un antimicrobiano posee frente a un número de especies bacterianas, mecanismo que clasifica a los antibióticos de amplio espectro o de espectro reducido.

Los antibióticos de amplio espectro tienen acción sobre una gran cantidad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos, como las cefalosporinas, aminoglucósidos y quinolonas. Los de espectro reducido actúan sobre un grupo más limitado de especies bacterianas, como la Vancomicina y la Eritromicina que actúan sólo sobre los Gram positivos (Quintana, 2002).

1.6. Ensayos de Espectro de Actividad

Las cepas certificadas utilizadas en la investigación para realizar la prueba de espectro de actividad fueron:

Las bacterias Gram positivas: *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633), así como el coco *Micrococcus yunnanensis*. Al mismo tiempo se usó la bacteria Gram negativa: *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027), patógeno oportunista responsable de una amplia gama de infecciones, principalmente nosocomiales que se encuentra presente en agua, suelos y plantas. En los hospitales puede ser encontrada en respiradores, vertederos, duchas y ocasionalmente en las manos del personal de salud (Roca, 2014). El bacilo Gram negativo que puede facilitar su presencia durante el debilitamiento del sistema inmunológico, *Serratia marcescens*, que produce colonias que pueden generar un pigmento de color rojo por poseer el colorante llamado prodigiosina (Patiño, Rodríguez, Raquel y Abitbol, 2005).

Se usó de igual manera el hongo saprófito conocido por ser el causante de la famosa infección: candidiasis, se hace referencia a *Candida albicans*.

1.7. Antibiosis microbiana

Se habla de antibiosis microbiana cuando una población microbiana es productora de una sustancia inhibitoria para otro microorganismo, que puede ser usada por estos individuos biológicos para eliminar a sus competidores e incrementar la vida del más apto o su supervivencia (Program II. Technology Generation and Transfer, 1991). También, se conoce el término antibiosis como, una relación entre especies donde se

va a producir un material durante el metabolismo natural de los microbios que elimina o inhibe otro agente infeccioso (Romero, 2007).

1.7.1. Microorganismos capaces de producir antibióticos

Se puede mencionar el descubrimiento de la Estreptomicina, antibiótico aislado de *Streptomyces griseus*, un organismo filamentoso de la familia *Streptomycetaceae* y orden *Actinomycetales* y la Neomicina, antibiótico aislado de *Streptomyces fradiae*. En el año 1939, René Dubos de la Fundación Rockefeller, investigando los gérmenes del suelo, descubre la Tirotricina, un antibiótico que llevó la atención nuevamente hacia la penicilina, dado que la Tirotricina era natural, obtenida por biosíntesis, de mecanismo de acción desconocido y poderosamente activa, aunque tóxica (Errecalde, 2004). Hallazgos y avances científicos permitieron a investigadores iniciar con la época antimicrobiana y con el paso de los años crear antibióticos eficientes que cumplan los requerimientos adecuados para tratamientos terapéuticos.

1.8. Resistencia a los antibióticos

En épocas que remontan a los años ochenta ya se creía que se habían encontrado toda clase de herramientas para controlar el desarrollo de microorganismos patógenos, no obstante, el uso generalizado e indiscriminado de los antibióticos aceleró el desarrollo de mutaciones en los microorganismos y la adaptación de los mismos a diferentes entornos, por lo que se volvieron cada vez más resistentes (Muñoz et al., 2004).

Cuando la Penicilina formó parte la práctica médica, la mayoría de *Staphylococcus aureus* aislados fueron susceptibles; sin embargo, para 1990, aproximadamente el 90

% de *Staphylococcus aureus* aislado era ya resistente a la penicilina, de esta manera algunas cepas fueron adquiriendo resistencia a los antibacterianos más utilizados. Un estudio elaborado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), afirma que el 60 % de las infecciones adquiridas por el personal y los pacientes en hospitales son causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos (Muñoz et al., 2004).

Como se sabe una colonia, una cepa o microorganismo puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos por diversas especies bacterianas. Las bacterias han ido adquiriendo resistencia a los avances farmacéuticos por su capacidad de producir enzimas que inactivan la acción de los antibióticos, debido al desarrollo de modificaciones que impiden que la acción del antibiótico sea eficaz y la llegada del fármaco al punto diana o en la alteración del propio punto diana. Por lo que los investigadores dedicados a solucionar las necesidades médicas de seres vivos deben centrarse en la continuidad de investigación sobre el tema, ya que cada día que transcurre una cepa puede llegar a ser resistente al último antibiótico desarrollado por la industria farmacéutica (Daza, 1998). El problema de resistencia a antibióticos ha preocupado a toda la industria farmacéutica, esta situación provoca una gran inquietud ante la perspectiva de que, a corto y largo plazo, la farmacología sea incapaz de tener el control sobre las enfermedades ocasionadas por agentes infecciosos, hasta ahora, curables (Muñoz, 2017).

1.9. Pruebas tipo antibiograma

Los antibiogramas son ensayos in vitro realizados en laboratorio bajo condiciones específicas y estandarizadas que proporcionan una respuesta a la susceptibilidad de los

microorganismos a una variedad de agentes antibacterianos. Independiente del método seleccionado, se debe escoger un medio de cultivo que permita un buen desarrollo del microorganismo, determinar con facilidad su sensibilidad y además no debe ejercer ninguna secuela de inhibición sobre la actividad antibacteriana de los antibióticos. Mueller Hinton Agar, es el medio de cultivo usado de manera constante en pruebas de sensibilidad de microorganismos aeróbicos de rápido crecimiento (Pedrique, 2002). Al ser un medio no selectivo que promueve el desarrollo de microorganismos, con baja presencia de inhibidores de tetraciclinas, sulfonamidas y trimetoprimas (Britania, 2001a).

1.10. Pruebas de identificación

1.10.1. Tinción Gram

Un método para poder clasificar las bacterias Gram negativas y Gram positivas es la tinción Gram, que permite tener una aproximación a la morfología de las bacterias. Esta técnica es denominada por el bacteriólogo Christian Gram en 1844, donde se usa una serie de reactivos que generarán una coloración que permitirá distinguirlas: cristal violeta, lugol, alcohol acetona, agua y safranina. Las bacterias Gram positivas y Gram negativas se tiñen de forma diferente por las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares; en el caso de las primeras la cantidad de peptidoglicano es del 80 al 90 % mientras que de las Gram negativas oscila entre el 10 y 20 % de la pared celular (Facultad de Medicina de Buenos Aires, 2017).

1.11. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas radican en la ejecución de diferentes test químicos aplicados a sistemas biológicos, en este caso microorganismos, que por medio de reacciones, permiten identificar microbios que han sido aislados de diferentes ambientes (Pérez, 2016).

1.11.1. Catalasa

Esta prueba tiene el objetivo de apartar las familias *Micrococacceae* (catalasa +) de los Géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (catalasa -). El fundamento de esta radica en que la enzima catalasa (presente en prueba positiva) en una bacteria con el fin de protegerse del efecto tóxico del peróxido de hidrógeno va a descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno, resultado del metabolismo aerobio de los azúcares (Seija, 2002).

1.11.2. Coagulasa

En esta una endocoagulasa que permanece unida a la pared celular actúa sobre el fibrinógeno que lleva a formar coágulos o grumos cuando se mezcla una suspensión bacteriana con plasma citratado. Mientras que una exocoagulasa que va activar el factor CRF (coagulase reacting factor), constituyendo un complejo coagulasa-CRF, que al reaccionar con el fibrinógeno produciéndose un coágulo de fibrina. Esta prueba permite separar *Staphylococcus aureus* (coagulasa +) de especies de estafilococos (coagulasa -) (Seija, 2002).

1.11.3. Kit de identificación BD BBL Crystal

El sistema de identificación BD BBL Crystal es destinado a la identificación miniaturizada, es decir una técnica en la que los implementos o materiales a usar son de fácil manejo por su tamaño. Una vez inoculados, los paneles proporcionan un sistema cerrado seguro y es preciso mencionar que su manipulación es sencilla. El sistema ha demostrado identificar con precisión cerca de 500 organismos (BD Company, 2018).

1.12. Efectividad del antibiótico en condiciones de estrés bacteriano

Las bacterias en general han demostrado tener habilidad de adaptarse a distintas condiciones de crecimiento que generaran respuestas a fin de asegurar su supervivencia, dichas respuestas son producidas gracias al estrés bacteriano, que son condiciones amenazantes que enfrentan las bacterias y que generan cambios adaptativos transitorios los cuales les permiten la producción de metabolitos secundarios en condiciones desfavorable de crecimiento. Dentro de estas condiciones podemos encontrar: agotamiento de nutrientes, cambios en el pH, temperatura, salinidad (Elizondo, 2014).

1.12.1. Estrés bacteriano en condiciones térmicas

La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan al crecimiento y a la supervivencia de los microorganismos, a temperaturas muy frías o muy calientes los microorganismos no crecerán. Ya que ejerce dos tipos de efectos opuestos sobre los

organismos vivos, conforme se eleva la temperatura las reacciones químicas y enzimáticas de la célula son más rápidas, y el crecimiento se acelera, pero a temperaturas por encima de la óptima para su crecimiento algunas proteínas del organismo puede sufrir daños irreversibles los cuales pueden afectarlo (Bernal, s. f.).

1.12.2. Estrés bacteriano en condiciones de pH

El pH es otro factor que interviene en el desarrollo de los microorganismos, cada organismo tiene un rango de pH dentro del cual es posible el crecimiento y normalmente posee un pH óptimo bien definido, la mayoría de los ambientes tienen un pH entre 5 y 9, los organismos que se encuentran dentro de este pH son los más comunes y solo algunas especies pueden crecer por debajo de pH 2 y por encima de 10, estos organismos son conocidos como extremófilos a pH bajos acidófilos y a pH alto alcalófilos. El factor crítico más importante para el carácter acidófilo es la estabilidad de la membrana citoplasmática, cuando el pH es neutro la membrana citoplasmática de las bacterias se disuelve y las células se lisan debido a que necesitan grandes cantidades de iones hidrógeno, en cuanto a los alcalófilos, se destaca que estos se encuentran en hábitats muy básicos como son los lagos sódicos y suelos carbonatados, dentro de estas se han encontrado organismos procariotas de la especie *Bacillus* (Bernal, s. f.).

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1. Obtención de muestras de suelo

Para llevar a cabo la recolección de muestras de suelo con el fin de aislar los microorganismos presentes en las mismas, es preciso recalcar que las muestras fueron proporcionadas por estudiantes de la cátedra de Biotecnología Industrial. El muestreo se realizó en los sectores de Guápulo perteneciente al cantón Quito y del Valle de los Chillos perteneciente al cantón Rumiñahui, estas muestras se mantuvieron en los laboratorios de ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana hasta su uso como fuente de microorganismos con actividad antibiótica.

Es importante estar al tanto de la adecuada manipulación de la tierra que se usó para la obtención de cepas antibacterianas, con el objetivo de que los organismos presentes en la muestra lleguen al laboratorio en óptimas condiciones. (Egas y Tinajero, 2016) recomiendan:

Muestras recolectadas a una profundidad de 5–10 cm de la superficie del suelo, las mismas que fueron mantenidas en recipientes estériles, a 30 °C de temperatura. Hasta la realización del análisis en los laboratorios de ciencias de la vida en la Universidad Politécnica Salesiana. (p.29)

2.2. Aislamiento de microorganismos de muestras de suelo

El segundo paso de la investigación es la purificación de los microorganismos obtenidos de muestras de suelo, estos procesos se realizaron de igual manera por los estudiantes de la cátedra de Biotecnología Industrial.

2.2.1. Suspensión de suelo en agua estéril

Se preparó una suspensión de 10 g de suelo en 90 mL de agua estéril, en matraces de 250 mL.

Posteriormente a esto se realizó la agitación de los matraces durante una hora con el objetivo de lograr resuspender bien los microbios adheridos a las partículas del suelo.

2.2.2. Serie de diluciones

Se calentó la suspensión de suelo durante 10 min a 30 °C y consecutivamente se realizó diluciones seriadas, para lo cual se toma 1 mL de la muestra total en 9 mL de agua estéril en un tubo de ensayo, alcanzando de esta manera una dilución de 10^{-1} , a partir de este se fue colocando la misma cantidad de suspensión en 9 mL de agua estéril en un tubo de ensayo, a partir de este segundo tubo se ejecuta la dilución del tercero y así sucesivamente hasta llegar a la dilución de 10^{-9} . En total se obtuvieron 9 tubos de ensayo.

2.2.3. Siembra de las diluciones

Se sembró 1 mL de cada dilución por extensión en placa en una caja con 25 mL de Agar Nutritivo (el medio se realizó en base a las condiciones del fabricante). Se incubó a 25 °C durante 3 días, para favorecer el crecimiento de microorganismos mesófilos.

2.2.4. Aislamiento de cepas

Una vez cumplido el tiempo de incubación, se observó los microorganismos que han crecido en las placas de Agar Nutritivo, se eligió la placa en la que haya entre 30 y 300 ufc. Se hizo un recuento de las ufc y este resultado se expresó en ufc/g (unidades formadoras de colonia/gramos) de suelo.

En las colonias en las que se observó misma morfología (borde, forma, entre otros), con la ayuda de un asa de cultivo en 25 mL de Agar Nutriente, se sembró una pequeña cantidad de ufc seleccionadas hasta poder tener un cultivo puro un cultivo totalmente homogéneo para continuar con la investigación.

2.3. Determinación de microorganismos productores de antibióticos

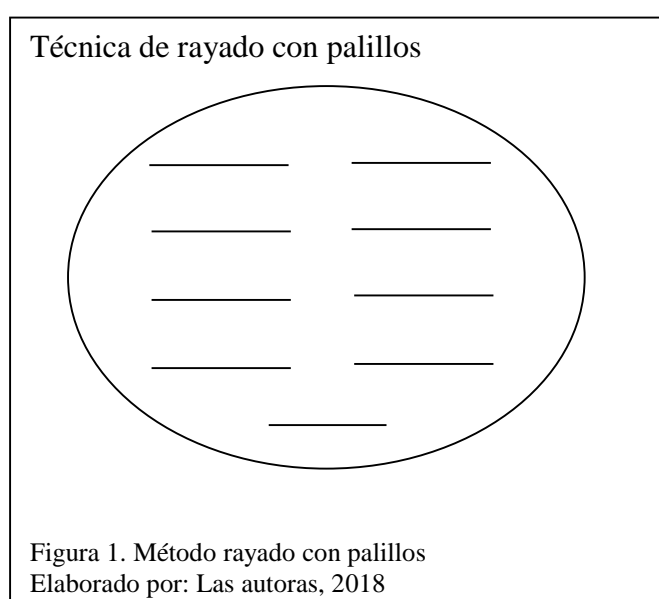
Este método se basa del mismo modo en una serie de procesos que serán detallados a continuación.

2.3.1. Prueba tipo antibiograma y Técnica de rayado con palillos

Con el propósito de poder seleccionar los microorganismos productores de antibióticos, las colonias seleccionadas se sometieron a una prueba tipo antibiograma, en la cual se enfrentaron a *Bacillus spizizenii* (Gram +) y *Pseudomona aeruginosa* (Gram -).

Se sembró en placas test algunos de los microorganismos aislados con el fin de obtener a partir de esta técnica las cepas con actividad antibacteriana. La placa test consiste en preparar 20 mL de Agar Nutritivo fundido a temperatura de 50 °C, a este se le añadió 1 mL de una suspensión de 0,5 McFarland de los microorganismos sensibles a los que se enfrentarán las cepas provenientes de suelo, verter en una caja Petri hasta solidificar.

Se continuó identificando en placas con Agar Nutriente las cepas aisladas que se difieran del resto en color, forma, etc. Sobre la placa test, con la ayuda de palillos estériles se sembró los antibacterianos en forma de estría, de 8 a 10 por placa, como se puede observar en la Figura 1. Se lleva a incubar a 25 °C durante 24 horas, de esta manera ayudando a que crezcan cepas aisladas del suelo.



2.3.2. Selección de cepas con actividad antibacteriana

Observar si alguna de las cepas sembradas en forma de estría ha generado un halo de inhibición alrededor de la estría.

Las cepas que presentaron halos de inhibición (PAP48 y PAP49 G3A) fueron designadas con un código el cual viene dirigido por semestres anteriores y que significa: P: Proyecto; A: Antibióticos; P: Periodo y número: número que se le establece depende el periodo en el cual fue colectada la muestra; G3A: grupo de cátedra que obtuvo respuesta positiva para antibiosis.

2.4. Caracterización de microorganismos productores de antibióticos

2.4.1. Tinción Gram

Con la ayuda de un mechero, se tomó la muestra (PAP48 o PAPA49 G3A) con un asa y se colocó en una gota de agua estéril sobre un portaobjetos, se fijó la muestra con la ayuda del fuego y se inicia la tinción Gram con la ayuda ciertos reactivos.

Se procedió conforme a la técnica de coloración de Gram, colocando unas cuantas gotas de cristal violeta sobre las muestras, se dejó actuar de uno o dos minutos, una vez terminado ese proceso se lavó y se añadió un par de gotas de lugol, se esperó un minuto y se vierte el exceso. El siguiente paso es decolorar durante 20 segundos con etanol o una mezcla de etanol: acetona, se lava con agua y se añadió safranina durante un minuto, se enjuaga con agua y se observó en el microscopio con objetivos de 40 X y 100 X, para este último se requiere de aceite de inmersión.

2.4.2. Prueba de catalasa

La manera en la que se va a llevar a cabo este tipo de prueba empieza por colocar una gota del peróxido de hidrógeno o H_2O_2 al 3 % sobre un portaobjetos, a continuación, se puso una pequeña cantidad de nuestra colonia con la ayuda de un asa y esperar a que se forme una emulsión, el resultado será positivo siempre y cuando se observe la formación de burbujas.

2.4.3. Prueba de coagulasa

Sobre un portaobjetos se generó una suspensión blanquecina un tanto espesa con una gota de suero fisiológico y varias colonias de cada cepa (PAP48 y PAP49 G3A), a esto se le agrega una gota de plasma citratado de conejo y se mezclan. Para realizar la interpretación de resultados, es necesario que la lectura se haga durante los primeros diez minutos de haber realizado la última mezcla, da como resultado positivo cuando hay evidencia de formación de coágulos.

2.5. Identificación de cepas con capacidad antimicrobiana

Para realizar este procedimiento se adquirió el Kit de identificación para bacterias Gram positivos, BD BBL Crystal, para lo cual se requiere un cultivo de 24 horas de incubación con el que se va a trabajar.

Como primer paso se procede a poner una porción de cada cepa en un tubo BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID de fluido de inóculo, se llevó a agitación en un Vórtex Mixer, de modelo VM-300 y marca Gemmy Industrial Corp., durante 10 a 15 segundos

y se observa la turbidez que debe ser equivalente a un patrón McFarland 0,5 (10^8 ufc). Se llevó la solución a una placa multipocillos, se vierte la misma, se toma la base con ambas manos, balanceándola suavemente hasta que los pocillos se llenen con el inóculo, se coloca la base sobre la mesa, se alinea la tapa de modo que el extremo donde se encuentra una especie de saliente pronunciada que tiene como función absorber la solución sobrante esté sobre el área demarcada de la base, se presiona la tapa hacia abajo hasta sentir una leve resistencia, lo siguiente es la incubación de los paneles (todos los paneles deben incubarse con la etiqueta hacia abajo) de 18 a 24 horas a una temperatura de 35–37 °C; si la incubación se realizó por 24 horas es preciso que la lectura se realice 30 minutos después de haber sacado los paneles de la incubadora.

Con la ayuda de la plantilla de reacciones de color se procede a la lectura de resultados, primero se leyó las columnas E-J, usando la luz blanca y luego se leyó las columnas A-D (substratos fluorescentes) usando la luz UV en el visor para paneles. Un pocillo con sustrato fluorescente se considera positivo únicamente si la intensidad de la fluorescencia observada en el pocillo es mayor que la del pocillo de control negativo (4 A).

Después de haber obtenido los resultados se realizó la obtención de un valor y se lo ingresa en la base de datos o sistema de identificación digital y se obtiene el nombre de la cepa antimicrobiana con la que se ha estado trabajando.

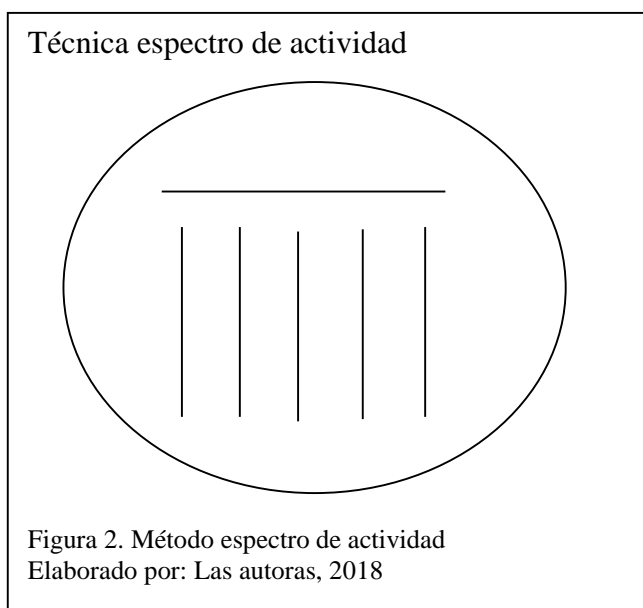
2.5.1. Espectro de actividad

Con el fin de establecer si el microorganismo es productor de un antibiótico de amplio o restringido espectro se realizó la prueba de espectro de actividad, para la cual es

necesario tener cultivos o resiembras de 24 horas tanto de las cepas certificadas (*Bacillus spizizenii*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida albicans*, *Micrococcus yunnanensis* y *Serratia marcescens*) como de *Micrococcus luteus* que corresponde a PAP49 G3A y *Streptococcus* grupo C/G correspondiente a PAP48, estas cepas fueron sembradas en Agar Nutriente e incubadas a 30 °C.

Se sembró perpendicularmente las cepas certificadas a 0,5 cm al área de crecimiento del microorganismo productor, con el fin obtener el espectro de actividad, como se puede observar en la Figura 2.

Para la cepa certificada *Micrococcus yunnanensis* se realizó esta prueba en agar sangre por los requerimientos de crecimiento de la cepa.



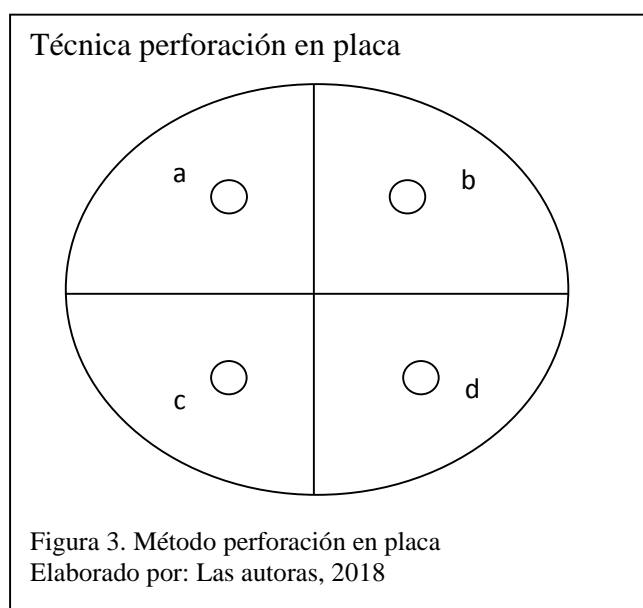
2.5.2. Método de perforación en placa

Se tomó 5mL de caldo de matraces que contenían medio TSB más la cepa PAP48 o PAP49 G3A incubados previamente 24 horas en agitación a 35 °C. Se colocaron los 5

mL de caldo en tubos de ensayo y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min en una centrifugadora de marca Gemmy Industrial Group, modelo PLC-05.

Por otro lado, se tenían listas cajas Petri con medio Mueller Hinton (25 mL aproximadamente) mezclado con 1ml de alícuota de *Pseudomonas aeruginosa* o *Bacillus spizizenii* en cada caja. Como siguiente paso se realizó en las cajas solidificadas un trazado con marcador para dividir la caja en 4 partes iguales y se realizó 4 pocillos con la ayuda de una pipeta Pasteur y en cada perforación se colocó 2 alícuotas (C y D) de 60 µL de caldo centrifugado, de igual manera se colocaron 60 µL de gentamicina (A y B) como control, como se observa en la Figura 3.

Se llevó las cajas a incubación durante 24 horas a 35 °C, concluido el tiempo se observaron los halos de inhibición.



2.6. Efectividad del antibiótico en condiciones de estrés bacteriano

Para este paso, se siguió la metodología establecida por (Egas & tinajero, 2016)

En el proceso para la obtención del antibiótico, es necesario evaluar las condiciones del medio en el cual se desarrollarán las bacterias en condiciones de estrés.

Se tomaron de referencia dos variables la temperatura y pH, con intención de estresar a las bacterias para la obtención de la sustancia requerida.

2.6.1. Preparación del preinóculo

Se preparó 2 tubos con 30 mL de medio TSB los mismos que se llevaron a auto clavar. Después en condiciones asépticas en cámara de flujo se inoculó las cepas PAP48 y PAP49 G3A respectivamente, las mismas que se llevaron a incubación durante 24 horas a 35 °C.

2.6.2. Siembra del preinóculo en condiciones de estrés bacteriana pH y temperatura

Se preparó 1500 mL de medio ISP2 y se colocaron 50 mL en 18 matraces Erlenmeyer de 250 mL. Se varió el pH de cada medio (6, 7, 8). Los matraces se taparon con tapones de algodón y se autoclavó. Después, se inoculó en cada matraz 3 mL del preinóculo (9 con PAP48 y 9 con PAP49 G3A) previamente preparado en medio TSB y se incubó en un agitador rotatorio a 150 rpm y a 25 °C. La producción del antibiótico se evaluó durante 10 días. Al día 10 se volvió a preparar 18 matraces Erlenmeyer con las mismas indicaciones de pH (6, 7, 8) y medio ISP2 y se incubaron a 30 °C, se evaluaron durante 10 días. Al día 20 se preparó 18 matraces Erlenmeyer con las mismas especificaciones de pH (6, 7, 8) con la temperatura a 35 °C, se evaluaron durante 10 días. Los tratamientos a seguir se observan en la tabla 4.

Tabla 4.

Tratamientos en la producción del antibiótico

Nº Tratamiento	pH	Temperatura (°C)
1	6	35
2	6	30
3	6	25
4	7	35
5	7	30
6	7	25
7	8	35
8	8	30
9	8	25

Elaborado por: Las autoras, 2018

2.7. Método de perforación en pocillo de agar

2.7.1. Preparación de cajas Petri

Se preparará 28 cajas Petri con medio antibiótico N°5, en el cual una caja participa de control para asegurarnos que el medio se encuentre totalmente limpio. Las 27 cajas Petri se dividen en 2 grupos. En 18 cajas se inoculó 1 mL de *Bacillus spizizenii* y en las 9 sobrantes con 1 mL de *Pseudomona aeruginosa*. Una vez solidificados los medios en las cajas Petri se realizó los pocillos con ayuda de pipetas Pasteur estériles.

2.7.2. Colocación del antibiótico en pocillo

Cada día se evaluó la producción del antibiótico tomando 5 mL del medio de cultivo ISP2 de los matraces que se encontraban en el agitador rotatorio, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos en una centrifugadora de marca Gemmy Industrial Group, modelo PLC-05.

Con ayuda de una micropipeta se tomó 60 μ L de la fase acuosa (fase superior) de los tubos anteriormente centrifugados, los cuales se colocó en los pocillos anteriormente elaborados en las cajas Petri. Finalmente se llevaron las cajas Petri con mucho cuidado a la incubadora durante 24 horas a 30 °C, para evaluar los halos de inhibición producidos por las sustancias antibióticas de las bacterias.

2.7.3. Análisis estadístico

Se realizó el análisis de “Área bajo la curva del progreso de antibiosis “(ABCPA) para obtener datos reales de la producción del antibiótico en los diferentes tratamientos en condiciones de estrés bacteriano durante los 10 días. Con ayuda de este análisis, se determinó las diferencias estadísticas entre los nueve tratamientos establecidos.

Para los análisis de varianza se procesaron en el programa InfoStat. Se desarrolló la prueba de Tukey al 5 %. Para ver las diferencias significativas en la evaluación de los diferentes tamaños de los halos de inhibición de los 9 tratamientos.

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1. Determinar microorganismos productores de antibióticos.

3.1.1. Pruebas tipo antibiograma

De las cepas aisladas y sembradas en medios de agar nutritivo, que se enfrentaron a: *Bacillus spizizenii* y *Pseudomona aeruginosa* en pruebas tipo antibiograma, se obtuvo un resultado en el cual PAP48 genera halos de inhibición para *Pseudomona aeruginosa* y para *Bacillus spizizenii* como se refleja en el Anexo 1. En cambio, para PAP49 G3A tiene acción antibiótica contra *Bacillus spizizenii* como se detalla en el Anexo 1.

Tabla 5.

Cepas seleccionadas con actividad antibacteriana

Cepa seleccionada	Actividad antibacteriana para <i>Pseudomona aeruginosa</i>	Actividad antibacteriana para <i>Bacillus spizizenii</i>
PAP48	Si	Si
PAP49 G3A	No	Si

Elaborado por: Las autoras, 2018

3.2. Tinción Gram y Caracterización morfológica

En cuanto a la tinción de Gram, una vez realizado el proceso se pudo obtener un resultado que son cocos Gram positivos tanto para PAP48 como para PAP49 G3A. Se puede evidenciar el resultado en el Anexo 4.

Tabla 6.

Cepas seleccionadas con actividad antibacteriana

Cepa	Resultado
PAP48	Gram positiva
PAP49 G3A	Gram positiva

Elaborado por: Las autoras, 2018

Una vez que las cepas fueron aisladas. Por medio de tinción Gram se pudo establecer que la forma de las dos cepas es cocos Gram Positivos, se analizó morfológico para determinar las características: forma, superficie, color, borde.

Tabla 7.

Caracterización morfológica de bacterias productoras de antibióticos

Código	Forma	Color	Superficie	Borde
PAP48	Irregular	Beige	Convexa	Ondulado
PAP49 G3A	Irregular	Beige	Convexa	Ondulado

Elaborado por: Las autoras, 2018

3.3. Pruebas bioquímicas

Las cepas PAP48 y PAP49 G3A se sometieron a pruebas bioquímicas. Las pruebas de catalasa y coagulasa dieron positivas, las mismas que se pueden observar en la tabla 8 y el Anexo 2 y 3.

Tabla 8.

Pruebas bioquímicas

Cepa	Prueba catalasa	Prueba coagulasa plasma de conejo
PAP48	Positivo	Positivo
PAP49 G3A	Positivo	Positivo

Elaborado por: Las autoras, 2018

3.4.1. Kits de confirmación: Kit de identificación (BD BBL Crystal)

Para lograr identificar las cepas, se usó el kit de identificación para bacilos y cocos Gram positivos, llamado BD BBL Crystal, los resultados que nos proporcionó este kit fueron: *Micrococcus luteus* (PAP49 G3A) y *Streptococcus* grupo C/G (PAP48), con el 98,69 % y 99,83 % de identificación respectivamente Anexo 7.

3.4. Confirmación de la actividad del antibiótico

3.5.1. Espectro

Una vez realizado el espectro de actividad para el cual se enfrentaron PAP48 y PAP49 G3A frente a cepas certificadas (*Bacillus spizizenii*, *Pseudomona aeruginosa*,

Candida albicans, *Micrococcus yunnanensis* y *Serratia marcescens*), se obtuvo como resultado que, PAP48 es un antibacteriano de amplio espectro, ya que tiene acción antibiótica para *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus spizizenii*. Para PAP49 G3A se identifica como espectro restringido, ya que actúa solo sobre *Bacillus spizizenii*.

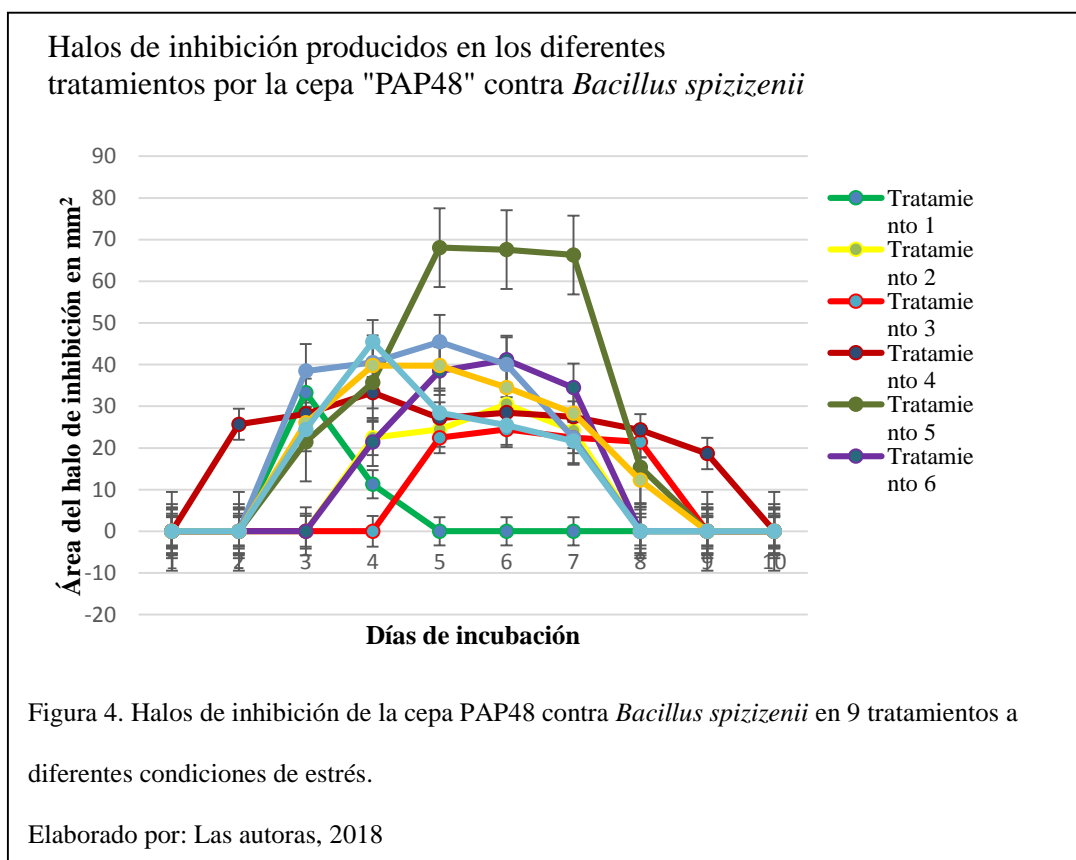
Es preciso enfatizar que los antibióticos de amplio espectro son los más eficaces para controlar las infecciones en centros de salud. Se puede observar una prueba de este tipo en el Anexo 9.

3.5. Valoración de la efectividad del antibiótico en condiciones de estrés bacteriana

En la producción de antibiótico se utilizaron 2 cepas PAP48 Y PAP49 G3A en medio ISP2, las mismas que fueron evaluadas durante 10 días bajo condiciones de estrés bacteriano: temperatura y pH, para las cual se utilizó el método de perforación en pocillo de agar, descrito previamente en metodología. La medición del tamaño de los halos de inhibición formados en el medio antibiótico N°5 que contenían *Bacillus spizizenii* y *Pseudomona aeruginosa*, se observa en las figuras 4 y 5, la cepa PAP48 produce actividad antimicrobiana contra *Bacillus spizizenii* y *Pseudomona aeruginosa* en el día 4, con el tratamiento 5, en condiciones de estrés de pH 7 y temperatura de 30 °C. Se puede observar en el Anexo 8 los halos de inhibición de PAP48 frente a *Pseudomona aeruginosa*. Mientras que en la figura 6, se observa que la cepa PAP49 G3A tiene mayor actividad antimicrobiana contra *Bacillus spizizenii* en el día 4, con el tratamiento 4 en condiciones de estrés pH 7 y temperatura de 35 °C. Se puede observar en el Anexo 8.

Ocampo (2011) asegura que, las fuentes nutricionales que se empleen son esenciales para el desarrollo de la bacteria y a su vez para la producción de metabolitos secundarios. La mayoría de los metabolitos secundarios son excretados al exterior de la célula, lo que puede estar relacionado con la eliminación del material tóxico.

Chaparro (2010) refiere que los metabolitos secundarios tienden a ser biosintetizados después de que la tasa de crecimiento sube, siendo estos más elevados si se condiciona a los microorganismos a condiciones de estrés como son salinidad, pH, temperatura, etc.



Halos de inhibición producidos en los diferentes tratamientos por la cepa "PAP48" contra *Pseudomona aeruginosa*

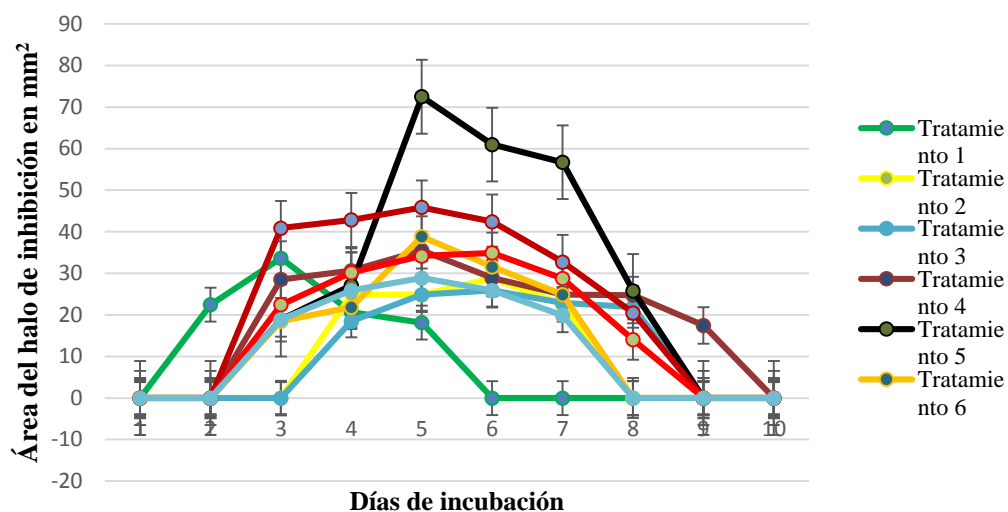


Figura 5. Halos de inhibición de la cepa PAP48 contra *Pseudomona aeruginosa* en 9 tratamientos a diferentes condiciones de estrés.

Halos de inhibición producidos en los diferentes tratamientos por la cepa "PAP49 G3A" contra *Bacillus spizizenii*

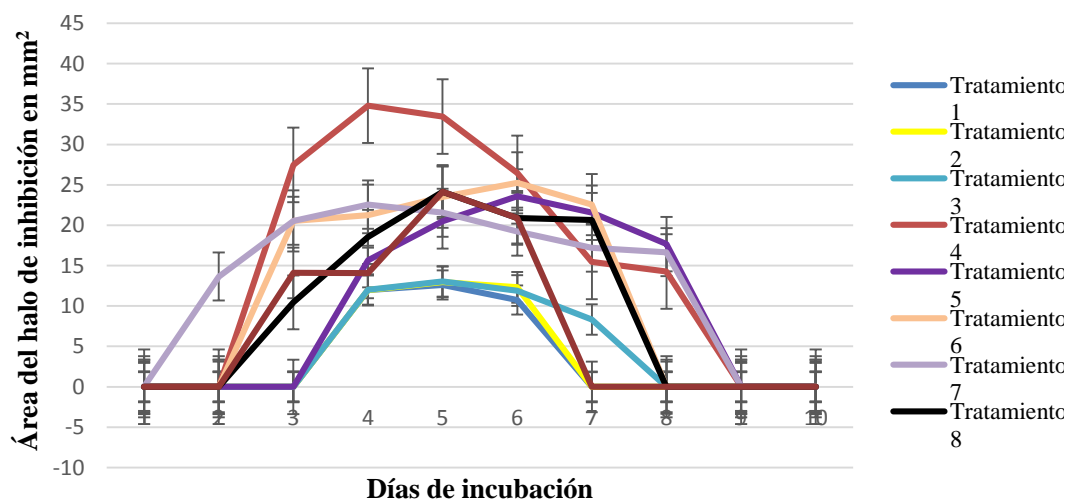


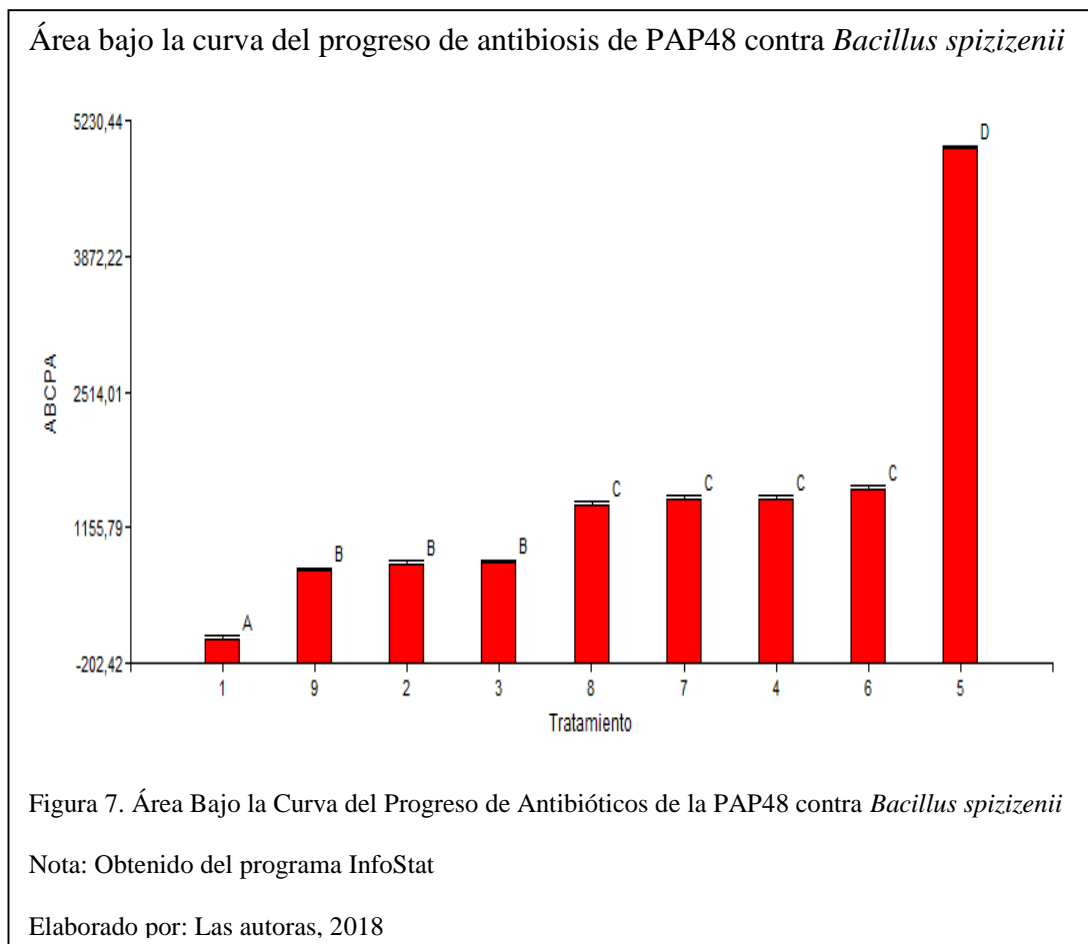
Figura 6. Halos de inhibición de la cepa PAP49 G3A contra *Bacillus spizizenii* en 9 tratamientos a diferentes condiciones de estrés.

Elaborado por: Las autoras, 2018

3.6. Análisis de varianza mediado por el Área Bajo la Curva del Progreso de Antibiosis (ABCPA). Prueba de Tukey (5 %)

3.7.1. Área Bajo la Curva del Progreso de Antibiosis de la cepa PAP48 contra *Bacillus spizizenii*

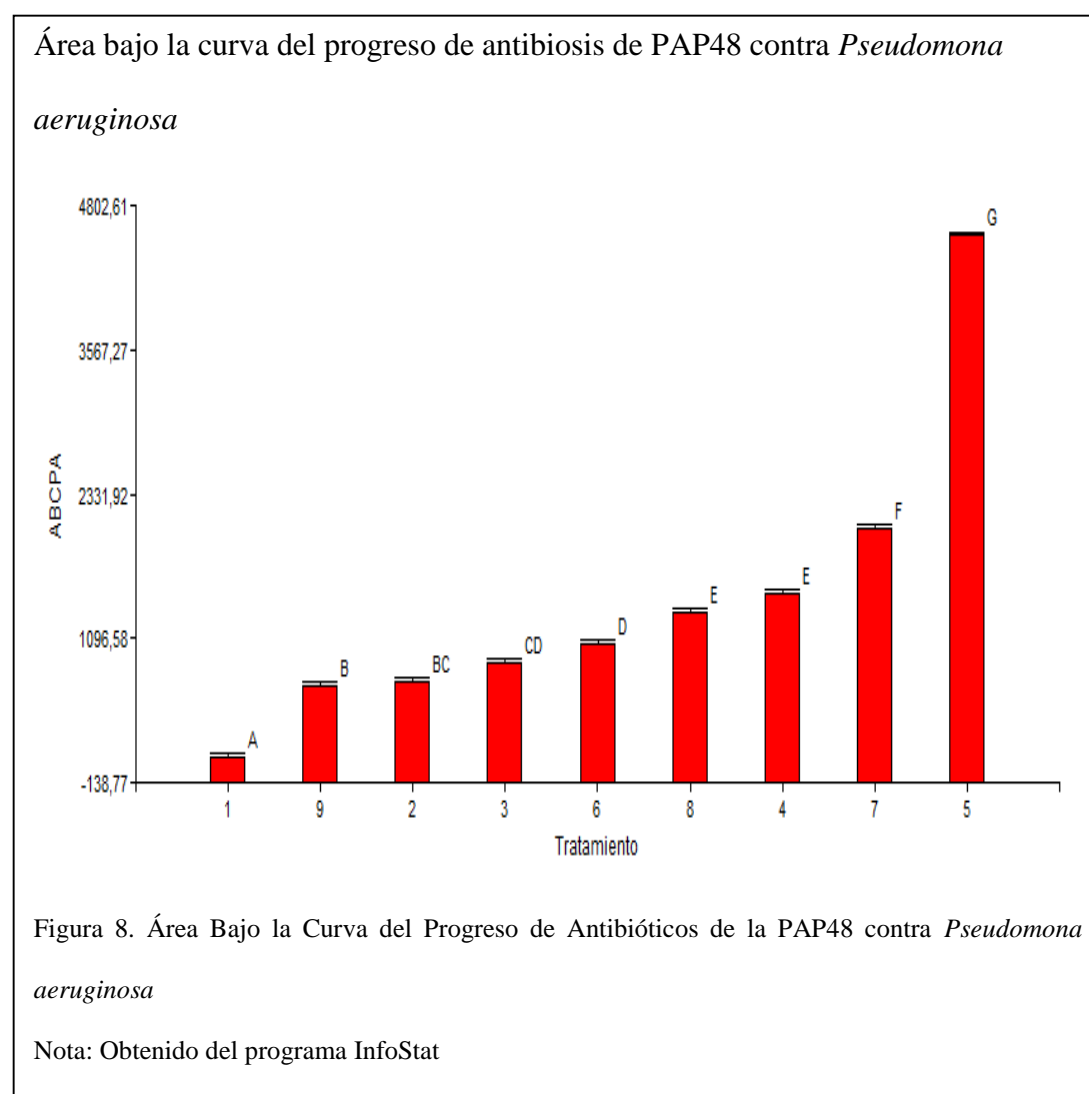
Mediante el cálculo de ABCPA a lo largo de 10 días tras la inoculación de la cepa PAP48 en diferentes condiciones de estrés bacteriano en pH y temperatura; se pudo observar que existieron 4 rangos de significancia en los 9 tratamientos, como se observa en la figura 7, se interpreta con la letra "A" el tratamiento 1 con ABCPA promedio de 44,52; con la letra "B" se representan los tratamientos 9, 2 y 3 con un ABCPA promedio de 718,67; 784,34 y 797,14 respectivamente, la letra "C" representa los tratamientos 8, 7, 4 y 6 con un ABCPA promedio de 1377,74; 1437,92; 1444,73; 1545,76 respectivamente tomando en cuenta que son tratamientos eficientes en la producción de halos de inhibición contra *Bacillus spizizenii* y por último se tiene la letra "D" que representa al tratamiento 5 con un ABCPA promedio 4948,10 siendo este el mejor tratamiento en estrés bacteriano en condiciones de pH 7 y temperatura 30 °C para la producción de metabolitos antibióticos.



3.7.2. Área Bajo la Curva del Progreso de Antibiosis de la cepa PAP48 contra *Pseudomona aeruginosa*

Mediante el cálculo de ABCPA a lo largo de 10 días tras la inoculación de la cepa PAP48 a 9 tratamientos en diferentes condiciones de estrés bacteriano en pH y temperatura. Se identificaron 8 rangos de significancia como se puede observar en la figura 8. En el rango “A” se tiene el tratamiento 1 con un ABCPA promedio de 85,83, muy bajo comparado con los demás rangos es decir es el peor tratamiento, en el rango “B” se tiene al tratamiento 9 con un ABCPA promedio de 684,87; existen también rangos intermedios como: “BC” con el tratamiento 2 con un ABCPA promedio de 727,08; rango “CD” perteneciente al tratamiento 3 con un ABCPA promedio de

892,95. Rango “D” con el tratamiento 6 con un ABCPA promedio de 1052,92; rango “E” con los tratamientos 8 y 4 con un ABCPA promedio 1319,98 y 1473,97 respectivamente, rango “F” con el tratamiento 7 con un ABCPA promedio de 2036,91 siendo uno de los mejores para la producción de la sustancia de interés y finalmente tenemos el mejor con un rango “G” con el tratamiento 5 con un ABCPA promedio de 4542,49 en estrés bacteriano en condiciones pH 7 y 30 °C.



3.7.3. Área Bajo la Curva del Progreso de Antibiosis de la cepa PAP49

G3A contra *Bacillus spizizenii*

Mediante el cálculo de ABCPA a lo largo de 10 días tras la inoculación de la cepa PAP49 G3A a 9 tratamientos en diferentes condiciones de estrés bacteriano en pH y temperatura. Se identificaron 7 rangos de significancia entre los 9 tratamientos como se puede observar en la figura 9, el rango “A” con tratamientos 1, 2 y 3 con un ABCP promedio de 81,04; 96,32 y 144,64 respectivamente, siendo estos los peores tratamientos en la producción de la sustancia antibiótica, el rango “B” con el tratamiento 9 con un ABCPA promedio de 275,40, el rango “C” con el tratamiento 8 con un ABCPA promedio 509,43; un rango intermedio “CD” en el tratamiento 7 con un ABCPA promedio de 580,43; rango “D” con el tratamiento 6 con un ABCPA promedio 636,11; rango intermedio “DE” con el tratamiento 5 con un ABCPA promedio de 696,77 y por último el rango “E” con el tratamiento 4 con un ABCPA promedio 813,60 siendo este el mejor de todos en la producción de la sustancia antibiótica en estrés bacteriano en condiciones de pH 7 y 35 °C.

Según Ferrera y Alarcón (2007) bajo diferentes condiciones de estrés, las bacterias son capaces de producir metabolitos secundarios, los cuales incrementan por falta de nutrientes o por ser expuestos a condiciones extremas, por lo cual su espectro de acción no serán los mismos ya que la célula bacteriana tiende a estresarse para adaptarse y producir diferentes metabolitos secundarios, los cuales le servirán para su sobrevivencia en medios de estrés.

Área bajo la curva del progreso de antibiosis de PAP49 G3A contra *Bacillus spizizenii*

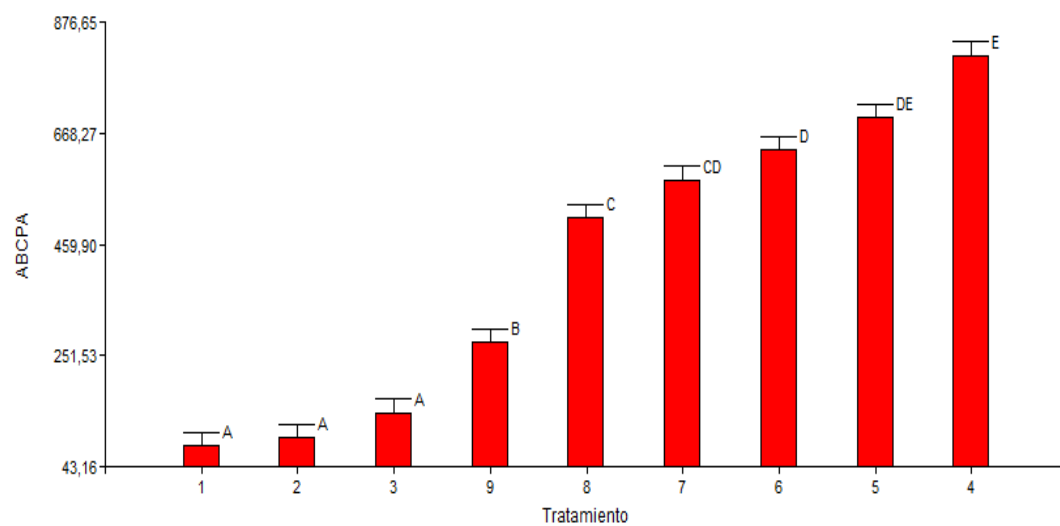


Figura 9. Área Bajo la Curva del Progreso de Antibióticos de la PAP49 G3A contra *Bacillus spizizenii*.

Nota: Obtenido del programa InfoStat

Elaborado por: Las autoras, 2018

Conclusiones

- Al caracterizar a PAP48, se establece que es una bacteria Gram positiva, en forma de coco, que presenta pruebas bioquímicas positivas de catalasa y coagulasa, tiene acción antibacteriana contra *Bacillus spizizenii* y *Pseudomona aeruginosa* en pruebas tipo antibiograma, lo que refleja ser un antimicrobiano de amplio espectro en test tipo espectro de actividad, en cuanto a su identificación, el Kit BBL Crystal refleja con un 99,83 % de confianza que PAP48 corresponde a *Streptococcus* grupo C/G.
- PAP49 G3A se caracterizó como una bacteria Gram positiva, en forma de coco, corresponde a un antiinfeccioso de catalasa y coagulasa positiva, tiene acción antibacteriana contra *Bacillus spizizenii* en pruebas tipo antibiograma, y refleja ser de espectro restringido en test tipo espectro de actividad, en cuanto a su identificación, el Kit BBL Crystal refleja con un 98,69 % de confianza que PAP49 G3A corresponde a *Micrococcus luteus*.
- *Streptococcus* grupo C/G tiene mayor actividad antimicrobiana contra *Bacillus spizizenii* y *Pseudomona aeruginosa* en el día 4, con el tratamiento 5, en condiciones de estrés de pH 7 y temperatura de 30 °C. Mientras que *Micrococcus luteus* tiene mayor actividad antimicrobiana contra *Bacillus spizizenii* en el día 4, con el tratamiento 4 en condiciones de estrés pH 7 y temperatura de 35 °C.

- En el cálculo de Área Bajo la Curva del Progreso de Antibiosis (ABCPA) de PAP48 contra *Bacillus spizizenii*, se obtuvo que el mejor tratamiento en estrés bacteriano en condiciones de pH 7 y temperatura 30 °C para la producción de metabolitos antibióticos, es el “D”, que corresponde al número 5 con un ABCPA promedio 4948,10.
- En el cálculo de Área Bajo la Curva del Progreso de Antibiosis (ABCPA) de PAP48 contra *Pseudomona aeruginosa*, el mejor tratamiento corresponde a un rango “G” con el tratamiento 5 con un ABCPA promedio de 4542,49 en estrés bacteriano en condiciones pH 7 y 30 °C.
- En el cálculo de Área Bajo la Curva del Progreso de Antibiosis (ABCPA) de PAP49 G3A contra *Bacillus spizizenii*, el mejor tratamiento corresponde al “E” o tratamiento 4 con un ABCPA promedio 813,60 siendo este el mejor de todos en la producción de la sustancia antibiótica en estrés bacteriano en condiciones de pH 7 y 35 °C.

Recomendaciones

- Realizar pruebas confirmatorias de identificación de las cepas PAP48 y PAP49 G3A, por medio de pruebas moleculares para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Hacer pruebas tipo antibiograma para establecer si las cepas PAP48 y PAP49 G3A pueden llegar a tener efectividad antimicrobiana contra otros microorganismos que no se usaron en la presente investigación.
- Intensificar la investigación de antibióticos desde la obtención de muestras en nuevos sistemas naturales como ríos, mares; con la finalidad de dar opciones de nuevos antimicrobianos para la problemática de resistencia a los antibióticos que se vive en la actualidad.
- Llevar a cabo tratamientos con otras variables, como salinidad, para evaluar si existe mayor efectividad de los antibacterianos PAP48 y PAP49 G3A.
- Efectuar la parte química del proyecto, en cuanto a obtención del antibiótico y estudio del mismo.

Lista de Referencias

- Asociación Argentina de Microbiología. (2016). Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología. Volumen I. Bacterias de importancia clínica. Horacio A. Lopardo.
- Asociación Vida Sana. (2015). Microorganismos del suelo y biofertilización. Recuperado de http://cultivos-tradicionales.com/upload/file/dossier-5_microorganismos-del-suelo-y-biofertilizacion-2.pdf
- BD Company. (2013). BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood. Recuperado de <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8760>
- BD Company. (2018). BD BBL™ Crystal™ Identification System - BD. Recuperado 2 de febrero de 2018, de <https://www.bd.com/en-us/offerings/capabilities/microbiology-solutions/identification-and-susceptibility-testing/bbl-crystal-identification-system>
- Bernal, J. (s. f.). Crecimiento bacteriano bajo condiciones de estrés requerido en el campo de microbiología.
- Britania. (2001a). Mueller Hinton Agar. Recuperado de <http://www.britanialab.com/productos/B23137%20REV%2001-MUELLER%20HINTON%20AGAR.pdf>
- Britania. (2001b). Sangre Agar Base. Recuperado de <http://www.britanialab.com/productos/HT%20B04149%20REV%2001-SANGRE%20AGAR%20BASE.pdf>
- Britania. (2015). Nutritivo Agar. Recuperado de http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a28446b169d8.pdf

- Bueno, S., Palavecino, C., Tobar, H., Nieto, P., & Sebastián, V. (2015). Libro de Apoyo al Profesor de Ciencias para 5to Básico: Microorganismos y Enfermedades.
- Casado, M. C., Torrico, G., & Medina, M. (2012). Medios de cultivo en un laboratorio de Microbiología [Guía de laboratorio]. Recuperado de <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>
- Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). (2012). Microorganismos Guía Técnica 4. Recuperado de https://www.jica.go.jp/project/elsalvador/0603028/pdf/production/vegetable_04.pdf
- Chaparro, A. (2010). *Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SPG 321 Mucor circinelloides y Evaluación de su actividad antimicrobiana*. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Daza, R. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 22(3), 57-67.
- Egas, C., & Tinajero, M. (2016). *Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelos de las Regiones Naturales de Ecuador*. (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito.
- Elizondo, J. (2014). *Termotolerancia media por exometabolitos entre Bacillus cereus y Geobacillus stearothermophilus*. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Errecalde, J. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. *FAO*, 162, 1-56.

- Facultad de Ciencias Agropecuarias. (2015). Guía de actividades prácticas. Microbiología Agrícola.
- Facultad de Medicina de Buenos Aires. (2017). Bacterias Gram positivas. Recuperado de http://www.fmed.uba.ar/depto/microbiologia/catedra2/Seminario_2_Bacteriologia%20C3%ADa_2%C2%B0_Cuatrimestre_2017.pdf
- Ferrera, R., & Alarcón, A. (2007). Capítulo 8. En *Microbiología agrícola*. Trillas.
- García, E. (2010). Prácticas de Microbiología. Recuperado de <http://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/micro2/practicas.pdf>
- García, I. E. (2011). Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. *Revista Argentina de Microbiología*, 43(1), 1-3.
- Ibáñez, J. (2015, agosto 5). Antibióticos del suelo y diversidad de los ecosistemas forestales [Mensaje en un blog]. Recuperado de <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2015/08/05/146514>
- Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). (2015). Análisis microbiológico de suelos. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/Av-1820.PDF>
- Lee, L., Cheah, Y., Sidik, S., Mutalib, N., Tang, Y., Lin, H., & Hong, K. (2012). Molecular characterization of Antarctic actinobacteria and screening for antimicrobial metabolite production. *Scopus*, 28, 112. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1018-1>
- Lucana, M., & Huanca, R. (2014). Estructura bacteriana. *Actualización Clínica Investigativa*, 49, 2589-2593.
- Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S., & Sánchez, J. (2010). Los Microorganismos: pequeños gigantes. *Elementos*, 77, 15-23.

- Morse, S. A., & Meitzner, T. A. (2011a). Capítulo 1. Bases de la microbiología. En *Microbiología Médica* (25ª, pp. 1-7). México: McGraw-Hill Interamericana Editores S.A.
- Morse, S. A., & Meitzner, T. A. (2011b). Capítulo 5. Cultivo de microorganismos. En *Microbiología Médica* (25ª, pp. 65-73). México: McGraw-Hill Interamericana Editores S.A.
- Mota, M., & Pérez, M. (2008). Morfología y Estructura Bacteriana.
- Muñoz, A. (2017). *Antibióticos en el suelo* (tesis de pregrado). Universidad Complutense, Madrid.
- Muñoz, K., Arango, G., & Jaramillo, M. (2004). Los antibióticos y su situación actual. *VITAE*, 11, 21-33.
- Nguyen, N. T., Nguyen, H. M., Nguyen, C. V., Nguyen, T. V., Nguyen, M. T., Thai, H. Q., ... Carrique-Mas, J. (2016). Use of Colistin and Other Critical Antimicrobials on Pig and Chicken Farms in Southern Vietnam and Its Association with Resistance in Commensal Escherichia coli Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3727-3735.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00337-16>
- Ocampo, A. (2011). *Obtención de metabolitos secundarios obtenidos en fermentación líquida de una cepa nativa aislada del páramo de Guasca, Cundinamarca de Mucor circinelloides y evaluación de su actividad antibacteriana*. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Patiño, S., Rodríguez, L., Raquel, T., & Abitbol, M. (2005, julio). Infección por *serratia marcescens*: caso clínico. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina*, (147), 16-17.

- Pedrique, M. (2002). Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (antibiograma). Recuperado de http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Antibiograma.pdf
- Pérez, M. (2016). Pruebas Bioquímicas. Recuperado de <https://es.slideshare.net/Marlenpmtz/pruebas-bioquimicas-61067684>
- Pérez, M. C. (2002). Morfología y Estructura bacteriana.
- Program II. Technology Generation and Transfer. (1991). Apéndice 5. Principios científicos para las investigaciones de campo con microorganismos. En *Guías Para la Liberación en El Medio Ambiente de Organismos Modificados Genéticamente* (p. 6970). Costa Rica: IICA.
- Quintana, A. (2002). Antibióticos. Bases microbiológicas del uso de antimicrobianos. Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2028.pdf>
- Quispe, G. D., & Hilari, L. (2014). Cocos Gram Positivos. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 49.
- Rada, J. (2016). Acinetobacter un patógeno actual. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 55(1), 29-48.
- Roca, L. (2014). Pseudomonas aeruginosa: un adversario peligroso. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 48(4), 465-474.
- Romero, R. (2007). Unidad 1. Capítulo 6. Quimioterápicos y antibióticos. En *Microbiología y Parasitología Humana* (3ª, p. 50). México: Panamericana.
- Sánchez, J. L. (2010). Bloque IV: Microbiología y Biotecnología. En *Biología de 2do de Bachillerato* (p. 29). Oviedo - España.

Schujman, G. (2018). Siembra, Aislamiento e Identificación de Microorganismos. *UNR*, 27.

Seija, V. (2002). Cocos grampositivos: Aspectos prácticos. Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2019.pdf>

Seija, V., & Vignoli, R. (2008). Principales grupos de antibióticos.

Sengupta, S., Pramanik, A., Ghosh, A., & Bhattacharyya, M. (2015). Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. *Scopus*, 15. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0495-4>

Vargas, T., & Kuno, A. (2014). Morfología Bacteriana. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 49, 2594.

Anexos

Anexo 1.

Prueba tipo antibiograma, PAP48 (A) y PAP49G3A (C) se enfrentan a *Bacillus spizizenii* y Prueba tipo antibiograma, PAP48 (A) y PAP49G3A (C) se enfrentan a *Pseudomona aeruginosa*



Anexo 2.

Prueba de coagulasa positiva para PAP48 y PAP49 G3A



Elaborado por: Las autoras, 2018

Anexo 3.

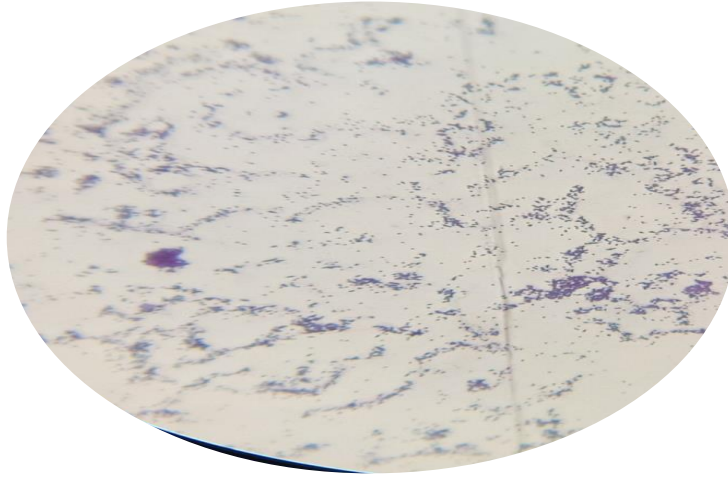
Prueba de catalasa positiva para PAP48 y PAP49 G3A



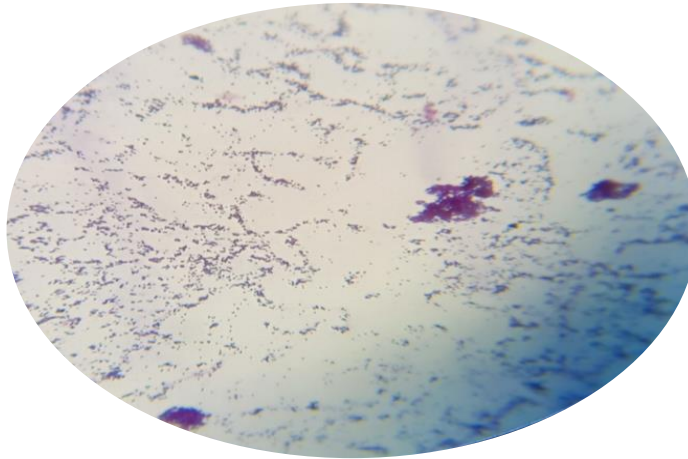
Elaborado por: Las autoras, 2018

Anexo 4.

Tinción de Gram para PAP48 y Tinción de Gram para PAP49 G3A



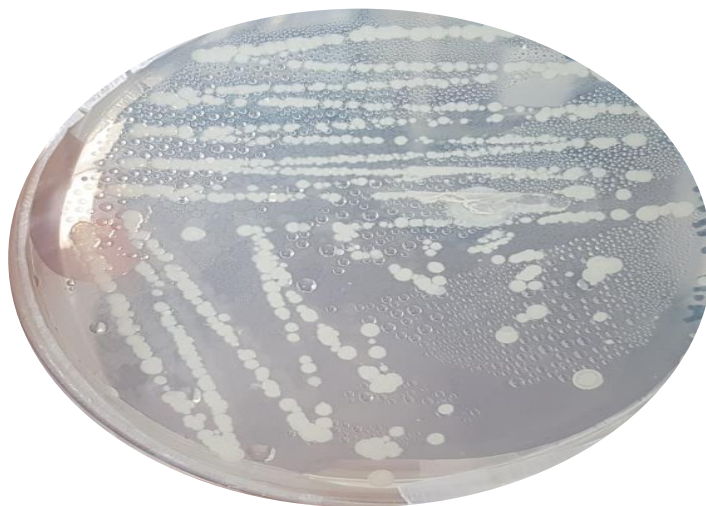
Elaborado por: Las autoras, 2018



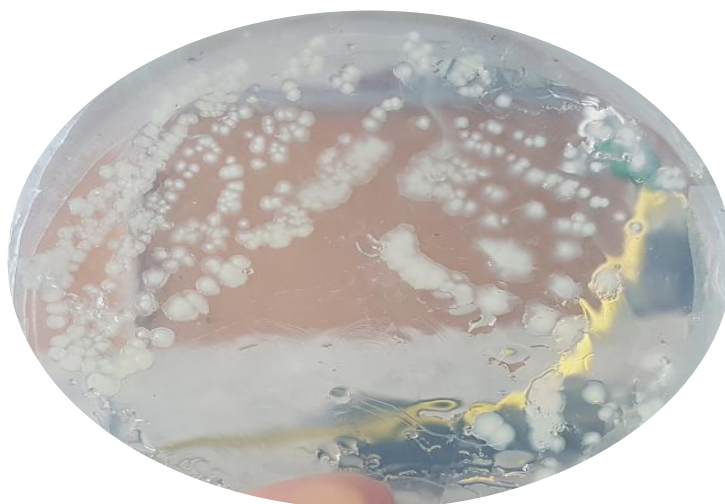
Elaborado por: Las autoras, 2018

Anexo 5.

Unidades formadoras de colonia aisladas de PAP48 y Unidades formadoras de colonia aisladas de PAP49 G3A



Elaborado por: Las autoras, 2018



Elaborado por: Las autoras, 2018

Anexo 6.

Kit de identificación BBL Crystal

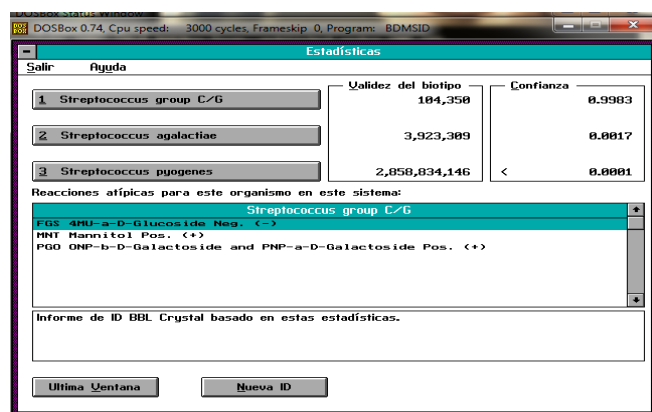


Elaborado por: Las autoras, 2018

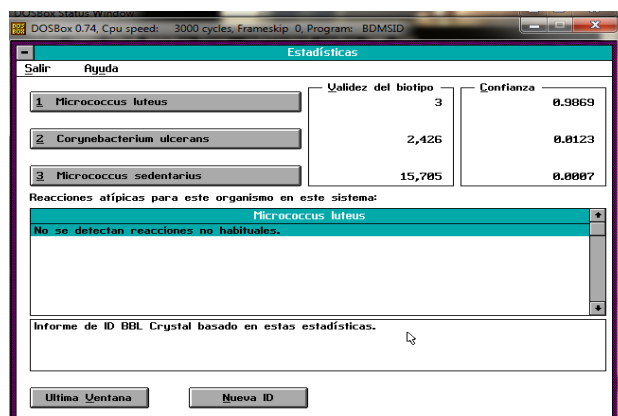
Anexo 7.

Identificación de la cepa PAP48 con el programa digital del Kit de identificación BBL Crystal

Identificación de la cepa PAP49 G3A con el programa digital del Kit de identificación BBL Crystal



Elaborado por: Las autoras, 2018

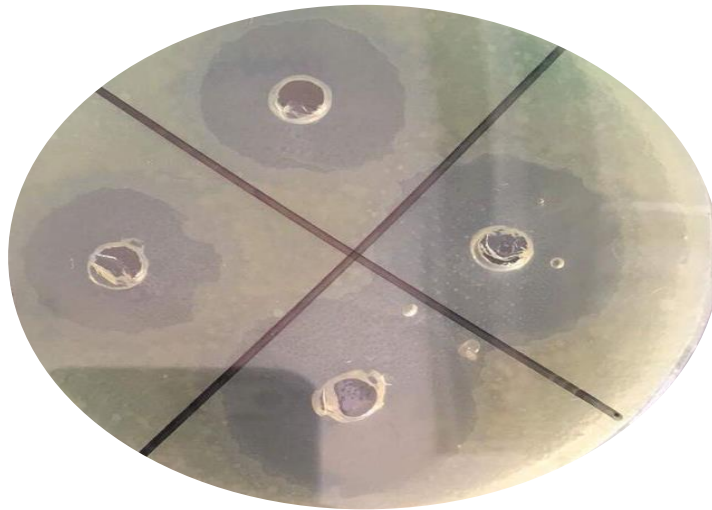


Elaborado por: Las autoras, 2018

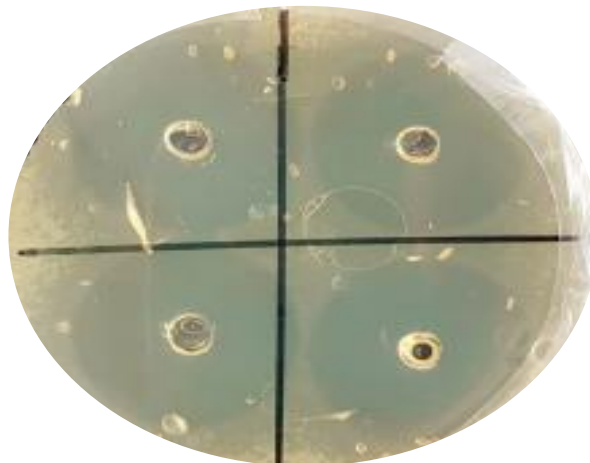
Anexo 8.

Prueba de perforación en placa de *Micrococcus luteus* contra *Bacillus spizizenii* y

Prueba de perforación en placa de *Streptococcus* C/G contra *Psuedomona aeruginosa*



Elaborado por: Las autoras, 2018



Elaborado por: Las autoras, 2018

Anexo 9.

Espectro de actividad de *Streptococcus* C/G contra *Bacillus spizizenii*

